

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO CLORO{2-[(4-HIDROXI-3-METOXIBENZILIDENO) AMINO]ESPIRO[ISOINDOLINA-1,9'-XANTENO]-3-ONA}MERCURIO(II): ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO USANDO FLUORESCENCIA MOLECULAR

SERGIO DAVID MOSQUERA GONZÁLEZ



UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
PROGRAMA ACADÉMICO DE QUÍMICA
SANTIAGO DE CALI

2015

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO CLORO{2-[(4-HIDROXI-3-METOXIBENZILIDENO) AMINO]ESPIRO[ISOINDOLINA-1,9'-XANTENO]-3-ONA}MERCURIO(II): ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO USANDO FLUORESCENCIA MOLECULAR

SERGIO DAVID MOSQUERA GONZÁLEZ

Trabajo de grado presentado como requisito parcial
para optar al título de *Químico*

Director:

RUBÉN ALBEIRO SÁNCHEZ ANDICA, M.Sc.

Co-director:

WALTER TORRES HERNÁNDEZ, Ph.D.



UNIVERSIDAD DEL VALLE

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

PROGRAMA ACADÉMICO DE QUÍMICA

SANTIAGO DE CALI

2015

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE ABREVIATURAS	5
RESUMEN.....	6
1. INTRODUCCIÓN	7
2. OBJETIVOS	9
2.1. OBJETIVO GENERAL	9
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
3. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES	10
3.1. QUÍMICA DE MERCURIO	10
3.2. QUÍMICA DE LOS MARCADORES FLUORESCENTES	10
3.3. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	11
3.4. ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	12
3.5. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.	13
3.5.1. Selectividad / Especificidad.....	13
3.5.2. Rango de Linealidad.	13
3.5.3. Linealidad.	13
3.5.4. Sensibilidad.....	13
3.5.4.1. Límite de detección..	13
3.5.4.2. Límite de cuantificación.	13
3.5.5. Precisión.	13
3.5.5.1. Repetitividad.....	13
3.5.5.2. Reproducibilidad.	14
3.5.6. Exactitud.	14
3.6. ANTECEDENTES	14
4. METODOLOGÍA.....	15
4.1. INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS.....	15
4.1.1. Instrumentación.	15
4.1.2. Reactivos.	15
4.1.3. Soluciones.....	16
4.2. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DEL LIGANDO	16
4.2.1. Síntesis y caracterización del precursor.	16
4.2.2. Síntesis y caracterización del compuesto 3, (reacción entre el precursor y 4-hidroxí-3-metoxibenzaldehído).....	17
4.3. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO DE MERCURIO	18
4.4. ESTANDARIZACIÓN DE LECTURAS DE FLUORESCENCIA.....	18

4.5. ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO USANDO EL QUIMIOSENSOR	19
4.5.1. Evaluación de tipo de solvente.....	20
4.5.2. Evaluación de la relación solvente:Agua.....	20
4.5.3. Evaluación del pH.....	20
4.5.4. Evaluación de la relación estequiométrica metal:ligando.....	20
4.5.5. Determinación del tiempo de formación del complejo.....	21
4.6. VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO USANDO EL QUIMIOSENSOR	21
4.6.1. Rango lineal y Linealidad.....	21
4.6.2. Precisión.....	21
4.6.3. Exactitud.....	21
4.6.4. Sensibilidad analítica: Límite de detección y Límite de cuantificación.....	22
4.7. MANEJO DE DATOS.....	22
5. RESULTADOS Y ANÁLISIS	23
5.1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DEL LIGANDO	23
5.1.1. Síntesis y caracterización del precursor.....	23
5.1.2. Síntesis y caracterización del compuesto 3, reacción entre el precursor y 4-hidroxí-3-metoxibenzaldehído.....	25
5.2. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO DE MERCURIO	30
5.3. ESTANDARIZACIÓN DE LA LECTURA DE FLUORESCENCIA	32
5.4. ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO USANDO EL QUIMIOSENSOR.....	35
5.4.1. Evaluación de varios tipos de solventes.....	35
5.4.2. Evaluación para determinar proporción entre Agua:Metanol.....	37
5.4.3. Evaluación del pH.....	38
5.4.4. Evaluación de la relación estequiometria metal:ligando.....	39
5.4.5. Determinación del tiempo de formación del complejo.....	40
5.5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO USANDO EL QUIMIOSENSOR.....	41
5.5.1. Rango lineal.....	41
5.5.2. Linealidad.....	43
5.5.3. Precisión.....	45
5.5.4. Exactitud.....	46
5.5.5. Sensibilidad analítica: Límite de detección y Límite de cuantificación.....	47
6. CONCLUSIONES.....	49
7. RECOMENDACIONES.....	50
8. BIBLIOGRAFIA	51

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	microlitros
b	Intercepto
CV	Coeficiente de variación
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
m	Pendiente
mL	mililitros
n	Número de datos
OMS (WHO siglas en inglés)	Organización Mundial de Salud
ppb	Partes por billón ó μgL^{-1}
ppm	Partes por millón ó mgL^{-1}

RESUMEN

La síntesis de quimiosensores fluorescentes y su aplicación en química analítica se ha incrementado en las últimas décadas debido a su alta selectividad y sensibilidad, disminuyendo costos de operación y facilidad, en algunos casos, en el tratamiento de muestras. Se entiende por quimiosensor, a un compuesto sintetizado (ligando) que en solución es inactivo, que al estar coordinado con un ion metálico puede activarse produciendo cambios de color, fluorescencia y fosforescencia, propiedades que pueden ser aprovechadas para cuantificación en química analítica. Un ejemplo de este tipo de ligandos son los derivados de la rodamina y fluoresceína, los cuales han presentado buena respuesta para medición de metales como cadmio, plomo, cobre, mercurio, entre otros por fluorescencia.

En este trabajo, se sintetizó un ligando derivado de rodamina B (2-[(2,4-dihidroxibenzilideno)amino]-3',6'-bis(dietilamino)espiro[isoindolina-1,9'-xanteno]-3-ona), mediante la reacción de la rodamina B hidrazida con 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído. Este compuesto resultó tener una buena intensidad de fluorescencia cuando se coordina con mercurio divalente. La reacción del ligando con mercurio se llevó a cabo bajo condiciones de temperatura ambiente, metanol:agua (1:1) como solvente y agitación constante, encontrando para el complejo una longitud de onda máxima de excitación a 553 nm y longitud de onda máxima de emisión a 575 nm. Y se estandarizaron las condiciones de acomplejamiento entre el ligando y el metal, evaluando la relación metal-ligando (relación limitante 1:2 Hg^{2+} :ligando), relación de solvente a usar (1:1 metanol:agua), pH de reacción (solución acuosa ajustada a pH 5,65) y estabilidad del complejo (tiempo superior a tres horas de reacción). Finalmente se validó, evaluando parámetros estadísticos que permitieran determinar la confiabilidad del método analítico, resultando tener un rango lineal entre 0,5 a 10 ppb, buena precisión (CV menor 5%), exactitud (recuperación promedio de 91%), límites de detección de 0,5 ppb y de cuantificación de 1,8 ppb.

1. INTRODUCCIÓN

El mercurio es un metal pesado que ha sido considerado como tóxico y venenoso en concentraciones bajas. Se incorpora a la cadena trófica a través de los alimentos, agua potable y aire, el cual se puede bioacumular hasta llegar a concentraciones que conducen a la intoxicación o la muerte¹. Su estado de oxidación más común es bivalente con el cual forma la mayoría de los compuestos, entre los cuales se encuentran los formados con carbono (organomercuriales), donde el más conocido es el metil-mercurio por ser generado en procesos naturales por microorganismos, el cual tiene un alto impacto al ambiente debido a su acumulación en peces de agua dulce y salada, así como también, en mamíferos marinos comestibles².

Este metal ha sido empleado por el hombre, a lo largo de la historia, en diferentes actividades de producción, por ejemplo, en la elaboración de instrumentos de medición³ (termómetros, barómetros, termostatos, electrodos, etc.), en procesos industriales⁴ (catalizadores de sales oxomercúricas), en extracción y transformación de oro⁵, en la industria farmacéutica⁶, entre otras. Este incremento en el uso del metal ha conllevado a la producción de desechos, los cuales han sido mal tratados y mal almacenados, produciendo una grave contaminación en el ambiente afectando la salud humana⁷.

Son muchos los reportes de los efectos tóxicos que el mercurio causa en el hombre^{8,9}, siendo la inhalación, ingestión y contacto las vías de ingreso más frecuentes, alterando algunas funciones del sistema nervioso y en consecuencia el sistema neurofisiológico.

Debido a los numerosos informes de investigadores sobre malformaciones y otros efectos tóxicos causados por altas concentraciones de mercurio^{10,11}, las entidades de salud han tenido que emitir regulación sobre el uso y las concentraciones mínimas de exposición. La OMS ha establecido los límites de exposición permisibles de mercurio en diferentes matrices ambientales y en muestras

biológicas, por ejemplo el valor mínimo permitido en agua potable es de 6 ppb de mercurio¹².

Considerando la alta contaminación por mercurio, se hace necesario realizar constantes monitoreos en efluentes naturales, suelos, aire y alimentos que permitan tomar medidas para disminuir su impacto. Se han desarrollado metodologías analíticas para medir la concentración de este metal utilizando diferentes técnicas analíticas, entre las cuales se destacan, el método colorimétrico de la ditizona, el método de voltamperometría cíclica y el método de espectrofotometría de absorción atómica empleando la atomización con generación de vapor frío. Estas técnicas son robustas y poseen límites de detección bajos, sin embargo, la adquisición y operación de estos instrumentos hace que el monitoreo de este metal tenga costos elevados y los estudios sean escasos.

Una técnica analítica alterna que está teniendo auge es la espectroscopía de fluorescencia molecular¹³, donde el uso de quimiosensores para detección de algunos iones metálicos ha permitido bajar los costos de operación, adquisición de resultados y en algunos casos, el tratamiento de muestras. Sin embargo y a pesar de sus evidentes ventajas de sensibilidad, selectividad, costos y operación, no se encuentran metodologías estandarizadas y validadas usando fluorescencia molecular en base a quimiosensores.

Con base a lo anterior, este trabajo está enfocado en desarrollar una metodología basada en la espectroscopia de fluorescencia molecular que permita un análisis cuantitativo de mercurio por medio de la formación de un quimiosensor (complejo mercurio-ligando) que sirva como alternativa de bajo costo en la determinación de este metal en muestras de agua.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Sintetizar un complejo de mercurio-rodamina y usarlo para la determinación de mercurio en agua usando fluorescencia molecular.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar y caracterizar un ligando derivado de la rodamina B hidrazida con 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído.
- Sintetizar y caracterizar el complejo cloro{2-[(4-hidroxi-3-metoxibenzilideno) amino]espiro[isoindolina-1,9'-xanteno]-3-ona} mercurio(II).
- Estandarizar una metodología analítica a partir del complejo sintetizado para la cuantificación de Hg^{2+} en agua potable.
- Validar el método analítico a partir del complejo de mercurio sintetizado, y aplicarlo a la determinación de mercurio en agua potable.

3. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

3.1. QUÍMICA DE MERCURIO

El mercurio es un elemento químico con número atómico 80, masa atómica 200,59 uma, densidad 13,6 g/mL, volumen atómico 14,8 y configuración electrónica $(\text{Xe})4f^{14}5d^{10}6s^2$. Estas propiedades fisicoquímicas le confieren una reactividad de ácido blando (cationes ricos en electrones d, d^{10} como el Hg^{2+}) concediendo al catión mayor polarizabilidad, y una preferencia muy marcada por ligandos grandes y polarizables (bases blandas). El mercurio al formar complejos puede presentar números de coordinación 2, 3, 4 y 6 para enlaces covalentes y 8 para enlaces iónicos, por lo tanto podrá formar estructuras con geometría lineal diagonal, trigonal, tetraédrica y octaédrica, en estas últimas se pueden presentar distorsiones dependiendo la estructura del ligando y para una estructura tetraédrica se establece una hibridación $sp^3 (s^0p^0)^{14}$.

3.2. QUÍMICA DE LOS MARCADORES FLUORESCENTES

En presencia de iones metálicos, los ligandos usados como quimiosensores, y en este caso los derivados de la rodamina, presentan un fenómeno conocido como apertura del anillo espirolactámico (cinco miembros) ^{15,16,17} originado inicialmente por la formación de un enlace (covalente o no) entre el ligando y el ion metálico, este enlace se debe a la carga parcial negativa sobre los átomos de N (anillo lactámico) y O (grupo carbonilo) presentes en el ligando, y a las condiciones donde se lleva a cabo el proceso. Posteriormente se abre el anillo y se produce una transposición de electrones desde el grupo carbonilo, pasando sobre el anillo xanténico, hasta finalmente producir la pérdida de un electrón sobre el átomo de nitrógeno, que sería la forma iónica que le permite emitir fluorescencia ^{15, 16, 17}.

Los ligandos que, unidos a un metal, emiten fluorescencia se denominan marcadores fluorescentes; estos pueden formar enlaces covalentes, iónicos, de Van der Waals o London con el analito de interés ¹⁸. Hay dos tipos de marcadores, los marcadores naturales, denominados intrínsecos, como proteínas y otros, y los

obtenidos a partir de síntesis. A los complejos metálicos de marcadores fluorescentes extrínsecos se les conoce como quimiosensores (*chemosensors*)^{19, 20, 21}. Estos últimos presentan mayor rendimiento cuántico y por lo general permiten el uso de cantidades de muestra que contengan bajas concentraciones de metal, adicionalmente son selectivos y han sido ampliamente explorados como herramienta analítica.

Entre los marcadores más empleados están, las rodaminas (figura 1).

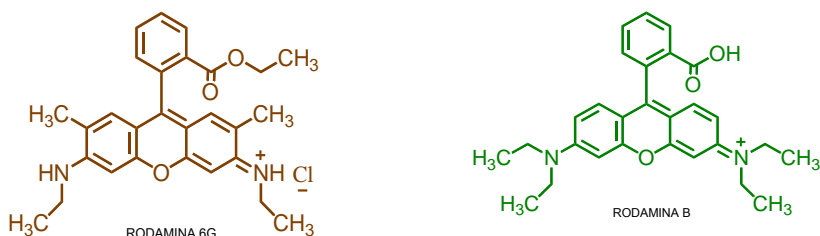
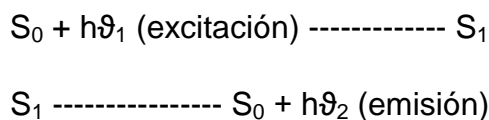


Figura 1. Rodamina 6G y Rodamina B.

Las rodaminas están basadas en un sistema conjugado que contiene un anillo de xanteno, con buenas propiedades fotofísicas^{22,23}, y otro de benceno, ambos sustituidos. Los múltiples sustituyentes de ambas unidades modulan sus características fotoquímicas y permiten cubrir una amplia gama de longitudes de onda de absorción y emisión²⁴.

3.3. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

La fluorescencia es un proceso de emisión en el cual las moléculas son excitadas por la absorción de radiación electromagnética. Las especies excitadas se relajan al estado fundamental liberando su exceso de energía en forma de fotones¹³. Un esquema del proceso sería:



donde S_0 y S_1 corresponden a los estados basal y excitado del ligando, y $h\nu$ es el fotón de longitud de onda apropiada. Nótese que los fotones de excitación y emisión se distinguen, ya que la emisión se produce a longitudes de onda mayores que las de excitación, fenómeno conocido como corrimiento de Stokes (figura 2, F_3)¹³.

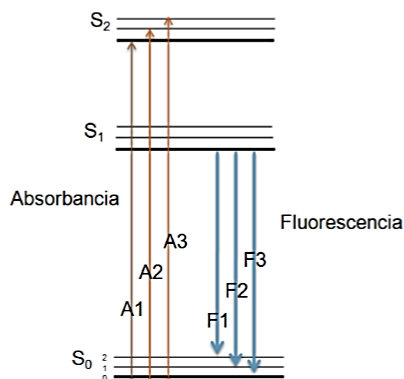


Figura 2. Diagrama de Jablonski ¹³

Para las mediciones se emplea un espectrofluorímetro con lámpara de Xenón y utilizando como detector el tubo fotomultiplicador, colocado a 90° en relación con la fuente de luz, y una celda de cuarzo para la muestra.

3.4. ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.

La estandarización de un método analítico hace referencia a la determinación de las mejores condiciones experimentales de trabajo de un procedimiento, utilizando la estadística como herramienta de decisión con el fin de obtener resultados con facilidad de adquisición. Los factores que pueden llegar a afectar medidas de fluorescencia y que se consideran como principales variables de evaluación son:

- ❖ **La temperatura.** Donde hay alta concentración de quimiosensor al aumentar la temperatura, la intensidad de la fluorescencia disminuye²⁵.

- ❖ **El solvente.** Causa desplazamientos batocrómicos, relacionado con cambios en la polaridad, constante dieléctrica y cambios en la polarizabilidad del medio que rodea el metal²⁵.
- ❖ **El pH.** La fluorescencia de un componente aromático con sustituyentes ácidos o básicos en el anillo depende normalmente del pH, debido a la diferencia en la longitud de la onda como la intensidad de la emisión para la forma ionizada y no ionizada del compuesto²⁵.

3.5. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.

Medidas que un método analítico debe seguir para poder ser validado: ^{26, 27}

- 3.5.1. Selectividad / Especificidad.** Capacidad de un método analítico para medir exacta y específicamente un analito sin interferencias.
- 3.5.2. Rango de Linealidad.** Es el intervalo de concentración del analito dentro del cual es confiable estadísticamente.
- 3.5.3. Linealidad.** Función de respuesta instrumental conocida como recta de calibrado, donde hay proporcionalidad entre concentración de analito y el sistema de respuesta.
- 3.5.4. Sensibilidad.** Existen dos tipos, la de calibración y la analítica. Esta última está dada por:
 - 3.5.4.1. Límite de detección.** Es la mínima cantidad de analito que puede ser detectado, aunque no cuantificarse con adecuada exactitud y protección.
 - 3.5.4.2. Límite de cuantificación.** Es la mínima cantidad de un analito que puede determinarse cuantitativamente.
- 3.5.5. Precisión.**
 - 3.5.5.1. Repetitividad.** Es la variabilidad del instrumento de medida empleando el análisis de muestra repetida.

3.5.5.2. Reproducibilidad. Es la variabilidad del método obtenida cuando se comparan los resultados de muestra, en función del tiempo, analista, reactivos, etc.

3.5.6. Exactitud. Es la relación porcentual entre los valores obtenidos con los valores definidos como teóricos.

3.6. ANTECEDENTES

Entre los trabajos que involucran la síntesis de ligandos para la detección de Hg^{2+} ; cabe destacar en primer lugar el realizado por Balint y colaboradores en 1997²⁸, empleado para la detección de mercurio en muestras de agua, en este trabajo no se presenta el proceso de apertura (fluorescencia) sino un fenómeno de quenching (reducción de la fluorescencia) entre la rodamina B con Hg^{2+} en presencia de yoduro, con el cual se obtuvo un límite de detección de 10 ppb Hg^{2+} . En el mismo año, Dujols, Czarnik y colaboradores²⁹ publicaron la síntesis de la Rodamina B hidrazida, la reacción entre la rodamina B con hidrato de hidracida pero en este caso se utilizó como quimiomedidor para Cu^{2+} y el cual también reporto selectividad para Hg^{2+} . Basado en este compuesto en los últimos años, se han sintetizado nuevos ligandos (resultado de la reacción del grupo amino libre de la rodamina B hidrazida con aldehídos), nuevos quimiosensores, y conjuntamente se han desarrollado metodologías para al estar en contacto con el Hg^{2+} en solución presenten fluorescencia, como en el trabajo de Kwon³⁰, Su³¹, Yang³² y colaboradores. Además se han sintetizado quimiosensores que han podido ser cristalizados por ejemplo el reportado por Chen y colaboradores³³. Debido al incremento en estos quimiosensores no solo para el mercurio sino para el cadmio, plomo y otros iones, se han publicado artículos que resaltan el desarrollo en este campo, como lo es el artículo de Culzoni, Muñoz de la Peña y colaboradores¹⁵, en el cual se exponen todos los quimiosensores para la detección de Hg^{2+} desarrollados recientemente (los últimos 20 años), basados en efectos sobre la espirolactama (no fluorescente) a la apertura del anillo amidico (fluorescente); además se reportan las propiedades espectroscópicas, las reacciones, parámetros

analíticos, interferencias por otros iones y sus aplicaciones analíticas. Otras publicaciones del mismo tipo se han reportado en trabajos de Kim¹⁶, Beija¹⁷, Lippard³⁴ y sus colaboradores.

4. METODOLOGÍA

4.1. INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS

4.1.1. Instrumentación.

- Medidor de punto fusión, Stuart SMP3.
- Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear, BRUKER DPX operado a 100 MHz y 400 MHz.
- Espectrómetro de masas, SHIMADZU-GCMS-QP-2010 usando ionización por impacto electrónico (IE) a 70 eV.
- Espectrofluorímetro JASCO FP-8500 con lámpara de Xenón.
- Cámara de fluorescencia, Spectroline Model CM-10 con dos longitudes de onda (254 y 365 nm).
- pH-metro digital, Thermo Scientific Orion 3 Star.
- Espectrofotómetro Shimadzu en el rango Ultravioleta-Visible.
- Purificador de agua, ThermoScientific

4.1.2. Reactivos.

- Acetona (Sigma Aldrich), etanol (Sigma Aldrich), cloroformo (Fisher Scientific), acetato de etilo (J.A.Baker), hexano (Sigma Aldrich), acetonitrilo (J.A.Baker) y metanol grado HPLC (Fisher Scientific).
- Rodamina B (Merck).
- Hidrato de hidracina (CODEX, Carlo Erba).
- Cloruro de mercurio (II) (Merck).
- Ácido clorhídrico (Sigma Aldrich).

- Hidróxido de sodio (J.A.Baker).
- Placas de sílica gel 60 F₂₅₄ con espesor 0.2 mm (Merck).

4.1.3. Soluciones.

- Ácido clorhídrico 0.002 N, 0.1 N y 0.5 N;
- Hidróxido de sodio 0.1 N, 0.5 N, 1.0 N y 50% (m/v).

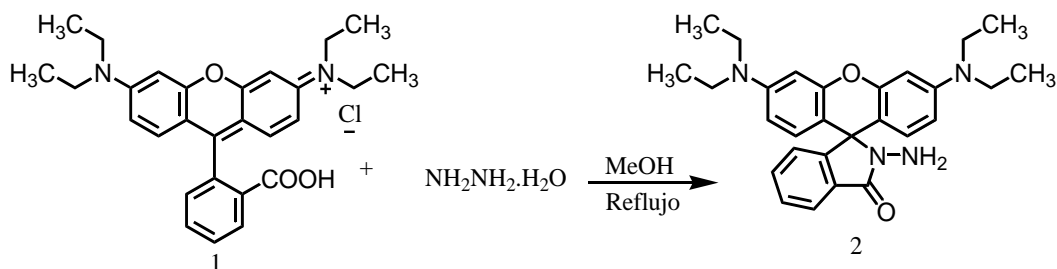
4.2. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DEL LIGANDO

La síntesis del ligando se realizó en dos etapas: la primera consistió en la modificación de la rodamina B para obtener un compuesto precursor y la segunda, la introducción del grupo quelante 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído al precursor.

4.2.1. Síntesis y caracterización del precursor.

La síntesis de Rodamina B hidrazida (precursor, figura 3) se hizo en base al procedimiento reportado por Virginie Dujols y colaboradores²⁹, el cual consistió en la reacción, en una sola etapa, entre la rodamina B con hidrato de hidracina en exceso de metanol y 23 horas de reflujo.

A una solución de rodamina B **1** (0.4076 g/15.0 mL metanol) se adicionó hidrato de hidrazina (0.70 mL) en agitación, la mezcla fue calentada a reflujo por 23 horas (esquema1). El producto obtenido **2** tuvo un rendimiento del 65%.

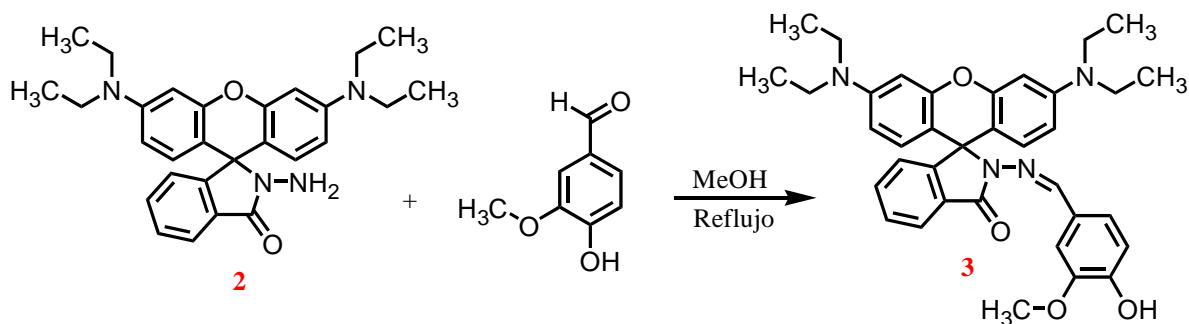


Esquema 1. Síntesis del precursor (rodamina B hidrazida) **2**

El precursor se caracterizó empleando espectros de infrarrojo, RMN ^1H , RMN ^{13}C , DEPT-135, espectro de masas y la toma de análisis elemental.

4.2.2. Síntesis y caracterización del compuesto 3, (reacción entre el precursor y 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído).

A una solución de compuesto **2** (0.1855 g/7 mL metanol), en agitación, se adicionó 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (0.0610 g) y se puso en refluxo por 3 horas. Posteriormente, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se rotavaporó hasta que se obtuvo un sólido. El sólido fue purificado mediante cromatografía de columna, utilizando acetato de etilo:hexano (7:3) como solvente de fase móvil, obteniendo un rendimiento de 78%. El compuesto aislado se secó y se guardó para posteriores reacciones (esquema 2).

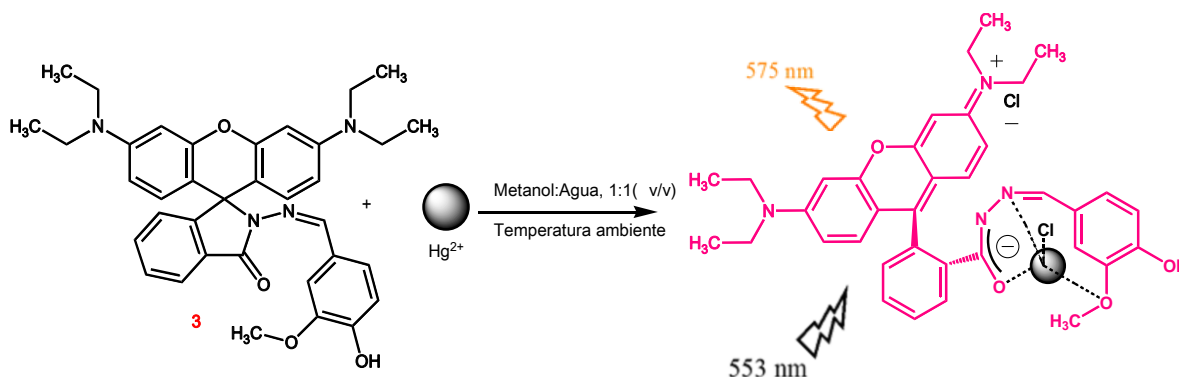


Esquema 2. Síntesis del precursor con 3-metoxi-4-hidrobenzaldehído.

El compuesto **3** se caracterizó empleando espectros de infrarrojo, RMN ^1H , RMN ^{13}C , DEPT-135, experimentos bidimensionales espectro de masas y la toma de análisis elemental.

4.3. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO DE MERCURIO

Mediante la preparación de una solución (5 ppm de Hg^{2+} con presencia del compuesto **3** (exceso)/25 mL agua:metanol (relación v/v, 1:1)), agitación constante y la posterior precipitación por la evaporación de los solventes, se sintetizó el complejo de mercurio con rendimiento de 55 %.



Esquema 3. Formación del complejo de mercurio y modo de enlace propuesto de **3** con Hg^{2+} .

El complejo de mercurio (figura 8) se caracterizó empleando espectros de infrarrojo, RMN ^1H , la toma de análisis elemental y la determinación de mercurio (solución acida del complejo) por absorción atómica empleando generador de vapor frío.

4.4. ESTANDARIZACIÓN DE LECTURAS DE FLUORESCENCIA.

La solución del complejo de mercurio se irradió con luz ultravioleta en una cámara de fluorescencia empleando dos longitudes de onda: 254 nm y 365 nm. Esta visualización se hizo para el ligando (blanco) y el complejo de mercurio.

La determinación de las longitudes de onda de absorción y emisión utilizando el espectrofluorímetro con ayuda del programa Spectra Manager (aplicación Spectra Measurement) y se establecieron las condiciones de lectura para la estandarización de un método analítico en el espectrofluorímetro, las cuales se

muestran en la siguiente tabla; para la parte de validación se empleó la aplicación Fixed Wavelength Measurement y los mismos parámetros.

Tabla 1. Parámetros establecidos del equipo.

Parámetros	
Measurement	Emission
Ex bandwidth	5 nm
Em bandwidth	5 nm
Response	1 sec
Sensitivity	Low, media, high
Em wavelength	553 nm
Measurement rank	400-750 nm
Data interval	1 nm
Scan speed	1000 nm/min
Auto gain	Off
Shutter control	Open only for measurement
Light control	Xe
Filter	Stop Scan
Spectral correlation	Off
No. Of accumulation	1 time

Con el fin de determinar si el ligando fluoresce en presencia de otros metales, se realizó la prueba de absorción y fluorescencia con varios iones metálicos, para ello se prepararon soluciones de 5 ppm de diferentes metales con el compuesto **3**, de igual preparación que Hg^{2+} , los iones metálicos empleados fueron Ag^+ , Al^{3+} , Ba^{2+} , Bi^{3+} , Ca^{2+} , Cd^{2+} , Cr^{3+} , Cr^{6+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Mo^{4+} , Na^+ , Ni^{2+} , Pb^{2+} y Zn^{2+} .

4.5. ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO USANDO EL QUIMIOSENSOR

El método analítico se fundamenta en la formación del quimiosensor, por tal motivo es necesario encontrar las condiciones experimentales para obtener la mejor respuesta (intensidad de fluorescencia), para ello se evaluaron los siguientes factores:

4.5.1. Evaluación de tipo de solvente.

Se preparó soluciones a una concentración de 5×10^{-4} M del compuesto **3** utilizando como solventes metanol, etanol y acetonitrilo. Posteriormente, tomando alícuotas de estas soluciones, para obtener una solución de quimiosensor con relación estequiometrica 1:1 metal:ligando, y al enrasar una concentración de 5 ppm Hg^{2+} . Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorio, por triplicado para cada solvente y como variable de respuesta intensidad de fluorescencia.

4.5.2. Evaluación de la relación solvente:Agua.

Se prepararon soluciones a diferentes fracciones molares entre agua:metanol, siendo estas 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 y 0.95 respecto a la cantidad de agua. Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorio, por triplicado para relación de solventes y como variable de respuesta intensidad de fluorescencia.

4.5.3. Evaluación del pH.

Se prepararon soluciones a una concentración de 5 ppm de Hg^{2+} utilizando los parámetros anteriormente establecidos. Los pHs ajustados para la proporción acuosa fueron 1.02, 3.02, 4.96, 5.65, 6.15, 6.97, 7.44, 8.94, 10.98 y 12.92. Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorio, por triplicado para cada pH y como variable de respuesta intensidad de fluorescencia.

4.5.4. Evaluación de la relación estequiométrica metal:ligando.

Se prepararon soluciones cada una con 5 ppm de Hg^{2+} donde se varió la concentración del quimiosensor, para establecer las siguientes relaciones estequiometricas 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 y 1:5 metal:ligando. Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorio, por triplicado para cada solvente y como variable de respuesta intensidad de fluorescencia.

4.5.5. Determinación del tiempo de formación del complejo.

Acorde a las condiciones encontradas anteriormente, se prepararon tres soluciones cada una con 5 ppm de Hg^{2+} con presencia de quimiosensor, y se midieron durante 200 minutos. Tomando como respuesta el tiempo (en minutos) en el cual se mantiene constante la intensidad de fluorescencia en su mayor valor.

4.6. VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO USANDO EL QUIMIOSENSOR

De acuerdo a las mejores condiciones encontradas, se realizó la validación para establecer que concentración de metal puede llegar a detectarse, y que tan preciso y exacto llega a ser.

4.6.1. Rango lineal y Linealidad.

Se realizó una curva de calibración con niveles de concentración desde 1 ppb hasta 5000 ppb Hg^{2+} . Cada curva se preparó en tres días diferentes. Los datos fueron tratados usando estudios de regresión.

4.6.2. Precisión.

La precisión se determinó mediante la reproducibilidad y la repetitividad. La reproducibilidad fue evaluada midiendo 6 muestras diferentes, en 3 días diferentes. La repetitividad se determinó mediante la medición de una misma muestra 6 veces, en 3 días diferentes. Los datos fueron tratados usando comparación con el coeficiente de variación (CV) y el de Horwitz.

4.6.3. Exactitud.

Se prepararon 6 réplicas de muestras dopadas con 2, 6 y 10 ppb de mercurio. Se digestó la muestra (10 mL) con ácido nítrico (1 mL) durante 10 minutos, posteriormente se ajustó pH a 5.65. Los datos fueron tratados usando comparación de las medias por distribución t con respecto al 100%.

4.6.4. Sensibilidad analítica: Límite de detección y Límite de cuantificación.

Se determinó mediante la lectura de 6 blancos y utilizando las ecuaciones 6 y 7 de la tabla 2.

Tabla 2. Tratamiento estadístico de los datos para la validación.

Parámetro	Criterio	Ecuación
RANGO LINEAL	Cálculo de residuos	Pruebas t, para comparar dos medias previamente realizando una prueba F
LINEALIDAD	Intervalo de confianza para tres curvas de calibración	$Y = (\bar{m} \pm \frac{tS_m}{\sqrt{n}})X + (\bar{b} \pm \frac{tS_b}{\sqrt{n}}) \quad (1)$ $S_m = \text{desviación estándar pendiente}$ $S_b = \text{desviación estándar intercepto}$
PRECISIÓN	Coeficiente de variación (%)	$\%CV = \frac{s}{\bar{x}} * 100 \quad (2)$
PRECISIÓN	Ecuación de Horwitz	$\%CV_{\text{horwitz}} = 2^{(1-0.5\log C)} \quad (3)$
EXACTITUD	Porcentaje de Recuperación	$\%R = \frac{W_{\text{experimental}}}{W_{\text{real}}} * 100 \quad (4)$
EXACTITUD	Prueba t de student	$t_{\text{calc}} = \left[\frac{100 - \%R}{s * \sqrt{n}} \right] \quad (5)$
SENSIBILIDAD	Medición de blancos	$LD = \bar{Y} + 3S \quad (6)$ $LC = \bar{Y} + 10S \quad (7)$

4.7. MANEJO DE DATOS

Se elige las mejores condiciones experimentales con base en análisis de varianzas para un solo factor (ANOVA), tomando como criterio la mayor intensidad de fluorescencia. Los datos fueron tratados empleando el programa EXCEL versión 2013.

Otros programas utilizados para la representaciones gráficas y el tratamiento de datos fueron: Chem Draw Ultra 7.0, Minitab 6 Statistical software y ACDlabs.

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS

5.1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DEL LIGANDO

5.1.1. Síntesis y caracterización del precursor.

Con la intención de sintetizar un precursor para la obtención de un ligando derivado de la rodamina B, se trabajó en base al reportado por Virginie Dujols y colaboradores²⁹. Los resultados de caracterización obtenidos (según la estructura en la parte superior izquierda de la figura 3), son los siguientes:

Sólido color rosado, rendimiento de 65%. Punto de fusión (190-191°C). IR (KBr), cm^{-1} : 3332, 2969, 2926, 1720, 1690. RMN-¹H (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ (ppm): 1.17 (t, $J=7.05$ Hz, 12 H, NCH₂CH₃), 3.345 (c, $J=7.05$ Hz, 8 H, NCH₂CH₃), 3.62 (s, 2 H, NH₂), 6.30 (dd, $J=8.78$, $J=2.25$ Hz, 2 H, xanteno H-2 y H-7), 6.43 (d, $J=2.25$ Hz, 2 H, xanteno H-4 y H-5), 6.465 (d, $J=8.78$ Hz, 2 H, xanteno H-1 y H-8), 7.06 - 7.18 (m, 1 H, Ar-H (6')), 7.39 - 7.52 (m, 2 H, Ar-H(4' y 5')), 7.89 - 8.00 (m, 1 H, Ar-H (3')); RMN-¹³C (100 MHz, Cloroformo-*d*) δ (ppm): 12.66 (-CH₃), 44.41(-CH₂), 65.95 (C- anillo espirolactama), 98.04(C-xanteno,(4 y 5)), 104.64 (Cq), 108.09(C-xanteno (2 y7)), 123.01(C-3'), 123.86(C-6') , 128.11 (C-xanteno (1,8)), 128.14 (C-4' o C-5'*), 130.07(Cq), 132.52(C-4' o C-5'*), 148.93(Cq), 151.59(Cq), 153.89(Cq), 166.17(C=O); EM (IE, 70eV), m/z (%): 456,25 (M⁺, 100), 397.20 (30), 326.10 (23), 213.15 (13), 57.10 (33), 43.10 (34). *Análisis elemental: Experimental, 72.70%C, 6.96%H, 12.21%N, 8.13%O; calculado, 73.64%C, 7.01%H, 12.27%N, 7.01%O.*

Otros investigadores²⁹ han obtenido el compuesto **2**, obteniendo los mismos resultados que en esta investigación. El nombre dado a este compuesto es rodamina B hidrazida y tiene la misma estructura propuesta.

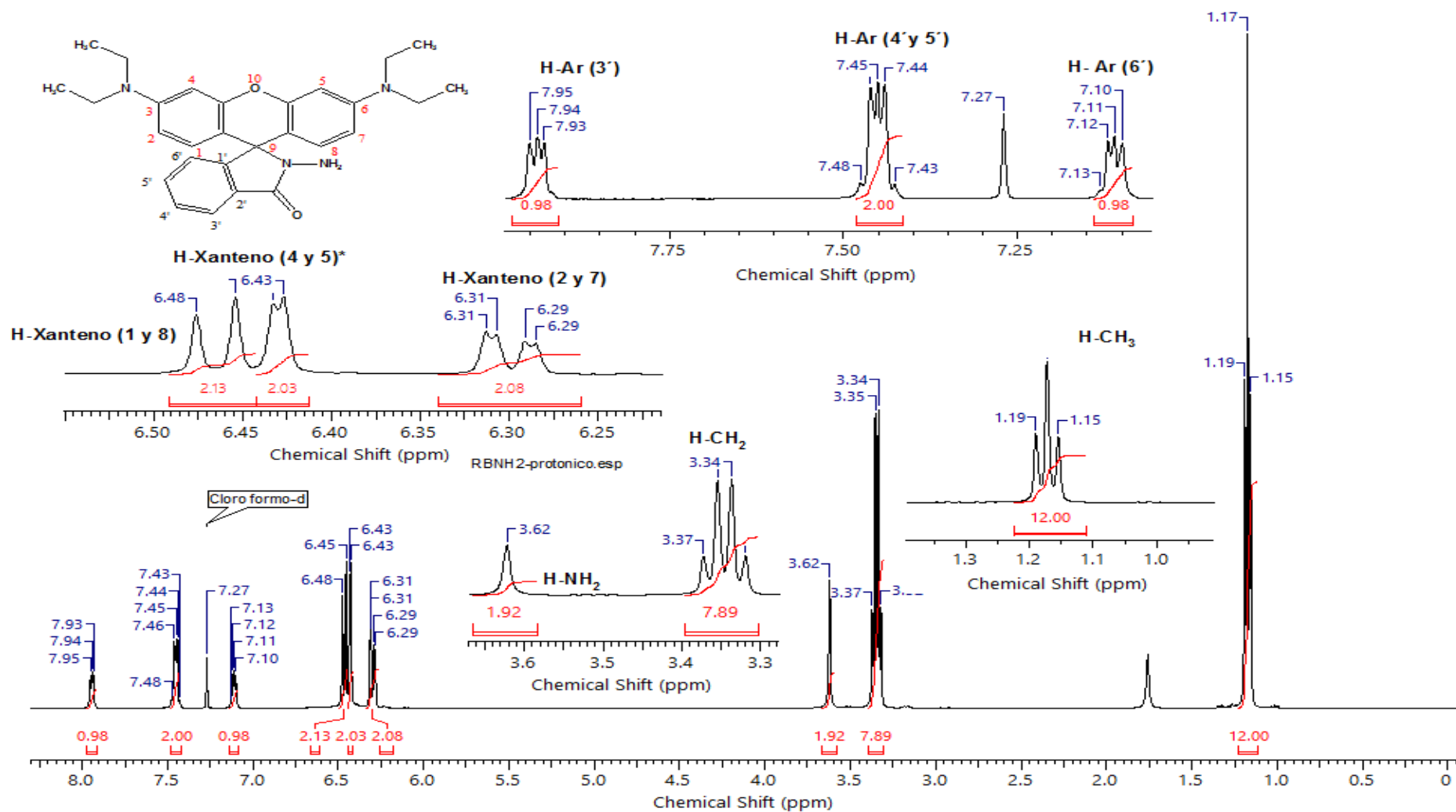


Figura 3. Espectro RMN ¹H (Cloroformo-*d*, 400 MHz) del compuesto **2**

5.1.2. Síntesis y caracterización del compuesto 3, reacción entre el precursor y 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído.

Empleando la síntesis enunciada en el numeral 4.2.2., en la cual se produce un enlace C=N (carbono imino) debido a la ataque nucleófilico del grupo amino libre de **2** sobre el carbono del grupo carbonilo (aldehído). Esta reacción se ve favorecida por la leve acidez de metanol para protonar al oxígeno carbonílico y no el nitrógeno (-NH₂).

La caracterización del compuesto **3** arrojó los siguientes resultados, de acuerdo a la representación de la estructura en la parte superior izquierda de la figura 6:

Sólido color morado, rendimiento de 78%. Punto de fusión (137-138°C). IR (KBr), 3500, 2969, 2926, 1720, 1690, 1100 cm⁻¹: RMN-¹H (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ (ppm): 1.16 (t, *J*=7.05 Hz, 12 H, NCH₂CH₃), 3.33 (c, *J*=7.05 Hz, 8 H, NCH₂CH₃), 3.91 (s, 3 H, OCH₃), 5.76 (s, 1 H, -OH), 6.25 (dd, *J*=8.78, *J*=2.25 Hz, 2 H, xanteno H-2 y H-7), 6.44 (d, *J*=2.25 Hz, 2 H, xanteno H-4 y H-5), 6.53 (d, *J*=8.78 Hz, 2 H, xanteno H-1 y H-8), 6.78(d, *J*= 8.00 Hz, 1 H, Ar-H (*m*- ó *o*-)*), 6.82 (d, *J*= 8.00 Hz, 1 H, Ar-H (*m*- ó *o*-)*), 7.11 - 7.16 (m, 1 H, Ar H-6'), 7.36 (s, 1 H, Ar-H-*o*'), 7.45 - 7.55 (m, 2 H, Ar H-4' y H-5'), 7.96 - 8.00 (m, 1 H, Ar H-3'), 8.55 (s, 1 H, N=CH). RMN-¹³C (100 MHz, Cloroformo-*d*) δ (ppm): 12.64 (-CH₃), 44.36(-CH₂), 55.95 (-OCH₃), 66.11 (C- anillo espirolactama), 97.88 (C-xanteno,(4 y 5)), 106.25 (Cq), 107.69 (C-*o*'), 108.07 (C-xanteno (2 y7)), 113.74(C-*m* ó C-*o*)*, 123.25(C-3'), 123.31(C-*m* ó C-*o*)*, 123.84(C-6') , 128.05 (C-xanteno (1,8)), 128.31 (C-4' o C-5')*, 129.61(Cq), 133.20(C-4' o C-5')*, 146.79(Cq-Ar), 147.22 (-N=CH), 147.59(Cq-Ar), 148.97(Cq), 151.62(Cq), 153.25(Cq-Ar), 153.90(Cq), 161.30 (-N=CH), 164.78(C=O), EM (IE, 70eV), *m/z* (%): 590 (M+, 5), 456 (73), 441 (24), 424 (19), 397 (25), 326 (21), 85(63), 83(100), 57(27), 43(23). *Análisis elemental: Experimental, 73.239%C, 6.222%H, 9.667%N, 10.872%O; calculado, 73.170%C, 6.436%H, 9.485%N, 10.840%O.*

En el espectro de IR del compuesto **3** (espectro Azul de la figura 4) se observan una banda de vibración de tensión cerca de 3500 cm^{-1} con una intensidad alta correspondiente al grupo -OH y otra cerca de 1100 cm^{-1} con una intensidad alta del grupo C-O-CH_3 ; estas bandas no aparecen en el espectro gris (figura 4) del compuesto **2**. Dos bandas de intensidad media correspondientes a los grupos metilo y metileno a 2969 cm^{-1} y 2926 cm^{-1} respectivamente y dos bandas agudas de intensidad fuerte a 1720 cm^{-1} y 1690 cm^{-1} que corresponden a la lactama de cinco miembros y al grupo C=O respectivamente, se mantienen en ambos espectros, lo cual hace presumir que la reacción se da por el grupo amino libre de la rodamina B hidrazida. Esta observación también la tuvo Wu y colaboradores¹⁷, quien publicó la reacción de Rodamina 6G hidrazida con 2-piridinacetaldehído por el mismo grupo, presentando evidencias similares.

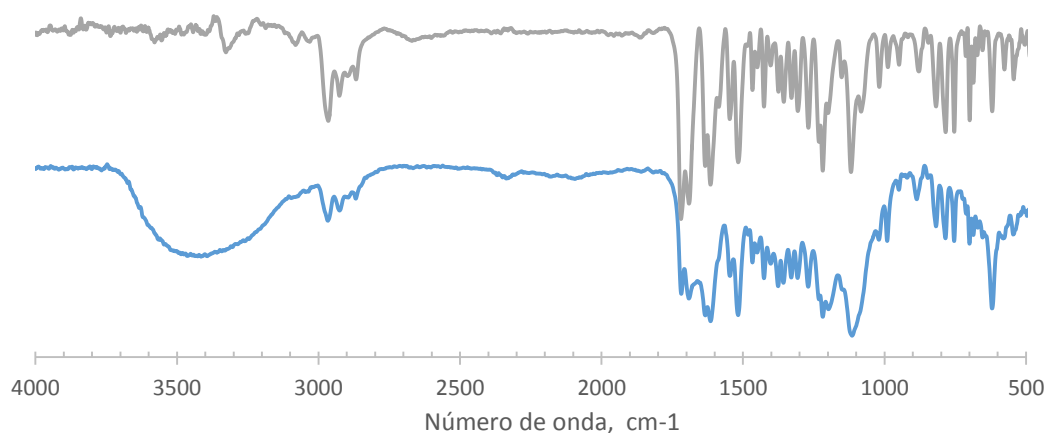


Figura 4. Espectro IR de la Rodamina B hidrazida **2** (gris) y compuesto **3** (azul).

Por otra parte, en el espectro de RMN ^1H del compuesto **3** (figura 6) se observa a 3.91 ppm una señal que corresponde a los protones del grupo metoxi (OCH_3), a 5.76 ppm aparece una señal que corresponde al grupo -OH , a 7.36 ppm, 6.78 ppm y 6.82 ppm señales que integran para un protón correspondientes a los protones del anillo bencénico adicionado H-o' , H-m^* y H-o^* respectivamente (estos dos últimos sin confirmar) y por último a 8.55 ppm la señal del protón enlazado al carbono del grupo imino (-N=CH). La ausencia de la señal a 3.62 ppm que debe

corresponder al grupo amino (NH_2), hace presumir que es por este nitrógeno que se da la reacción, formando el grupo imino. El espectro de RMN ^{13}C del compuesto **3** (figura 7) exhibe una nueva señal a 55.95 ppm para el carbono del grupo metoxi (OCH_3) del 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído que queda incluido en la estructura de **3**. También se advierten las señales a 153.25 ppm, 147.59 ppm y 146.79 ppm correspondientes a los carbonos cuaternarios del anillo aromático adicionado, y cuatro señales para carbonos terciarios (CH) a 128.31 ppm, 113.74 ppm, 107.69 ppm y 147.22 ppm que corresponden a C-m^* , C-o^* , $\text{C-o}'$ y al carbono iminio respectivamente. La señal del carbono carbonílico de la lactama aparece a 164.78 ppm indicando que el oxígeno se encuentra en su forma C=O . La señal del carbono espirolactámico aparece a 66.11 ppm, lo cual sugiere que el anillo no se abre durante la reacción manteniendo su estructura. Resultados similares se reportan en los trabajos de Kim¹⁶, Chen²⁴ y Kwon³⁰ y sus colaboradores.

El peso del ion molecular se puede observar en el espectro de masas del compuesto **3** a 590 m/z, el cual coincide con la masa de la fórmula molecular $\text{C}_{36}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_4$, adicionalmente, el espectro muestra dos señales adicionales que corroboran la estructura propuesta: el pico base a m/z 83 y el pico a m/z 456, que corresponde a la fragmentación del compuesto por el enlace imino (figura 5).

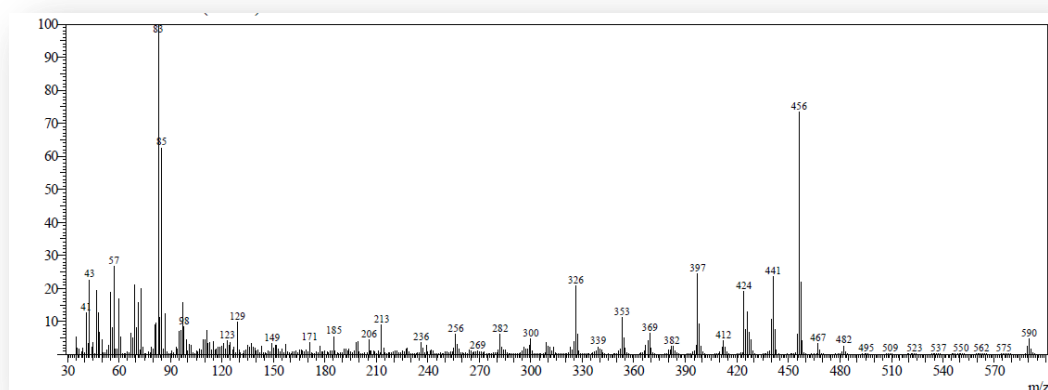


Figura 5. Espectro de masas del ligando **3**.

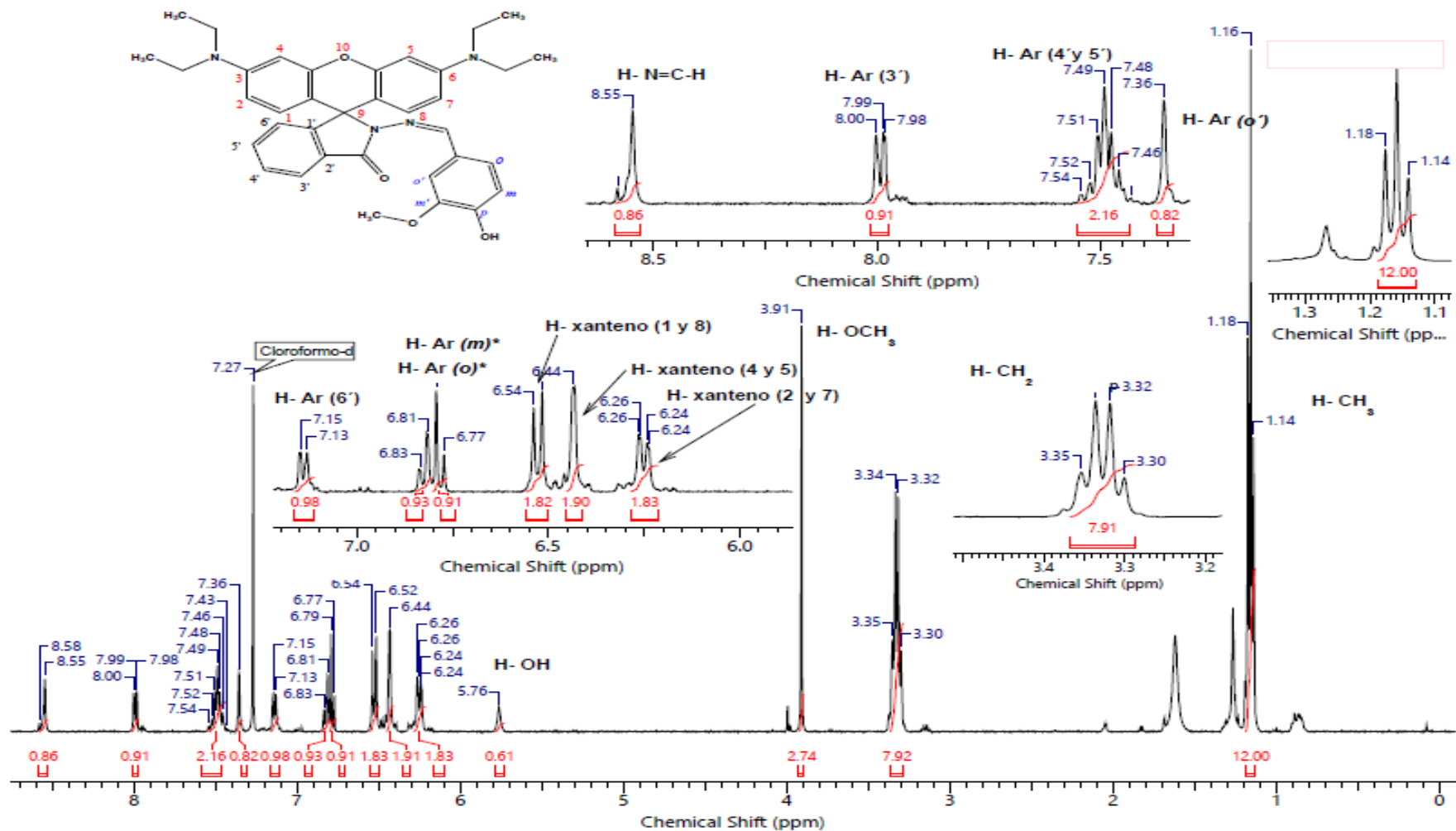


Figura 6. Espectro RMN ¹H (Cloroformo-*d*, 400 MHz) del compuesto **3**.

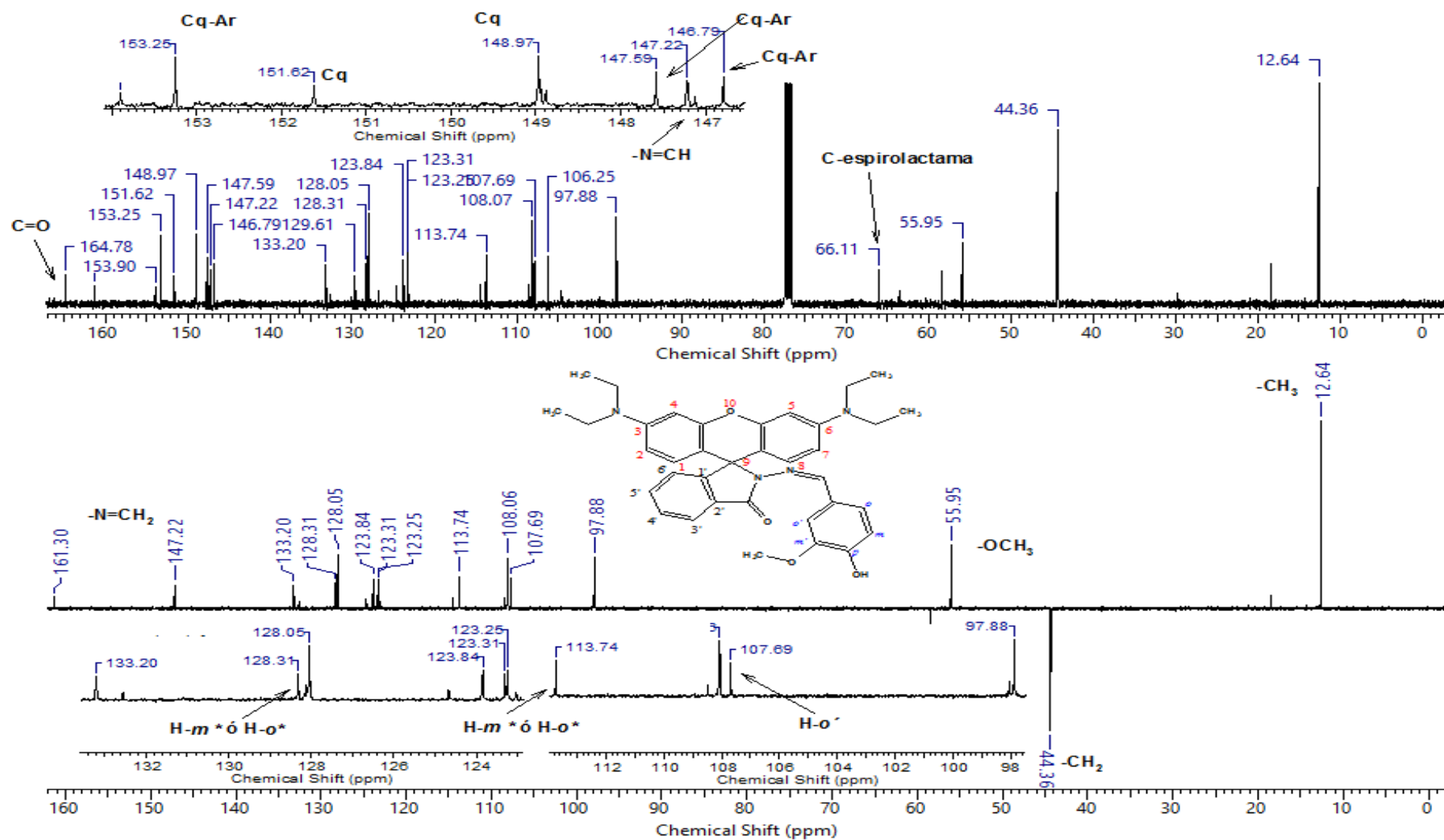


Figura 7. Espectro RMN ¹³C y DEPT-135 (Cloroformo-d, 100 MHz) del compuesto 3.

Con base en lo anterior se puede presumir que la estructura propuesta para el compuesto **3** es coherente. Es de anotar que este compuesto no se encontró reportado en las bases de datos, lo cual podría presumirse que se trata de un nuevo compuesto, el cual recibiría el nombre 2-[(4-hidroxi-3-metoxibenzilideno) amino]espiro[isoindolina-1,9'-xanteno]-3-ona.

5.2. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO DE MERCURIO

En la síntesis del complejo de mercurio (según el numeral 4.3 de la metodología) se obtuvo un sólido de color violeta. Este complejo en solución origina un color rosado y al producir la fluorescencia emite un color anaranjado (figura 9).

El análisis del espectro de infrarrojo del complejo es similar al del ligando mostrando las bandas características del ligando en el complejo, como las bandas de los grupos metilos y metilenos, el grupo éter y el grupo OH (disminución de intensidad). Sin embargo, aparece un desplazamiento de la banda de tensión asimétrica del -C=O de 1690 cm^{-1} a 1610 cm^{-1} , y la banda de tensión simétrica a 1430 cm^{-1} , propio de enlaces de metales al oxígeno de grupos carbonilos (COO-)¹⁴.

El espectro protónico del complejo evidencia las mismas señales que para el quimiosensor solo, pero se observa un desplazamiento químico de la señal para -OCH_3 a 3.82 ppm, de la señal de =N-CH a 8.40 ppm, además, también se observa un ensanchamiento en las señales de los grupos imino y los protones aromáticos de la estructura xanténica y bencénica. Estos fenómenos parecen ser debidos al efecto de cercanía de mercurio sobre los protones más cercanos al sitio de coordinación. Este comportamiento se reporta el trabajo de Wang y colaboradores³⁵, donde hay una reacción entre Hg^{2+} y un derivado de la rodamina B.

Los resultados del análisis elemental (tabla 3) sugieren un compuesto de fórmula empírica $\text{Hg}(\text{C}_{36}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_4)\text{Cl}$, la cual tiene una concordancia del 96.6% con la estructura teórica.

Tabla 3. Valores teóricos y experimentales del análisis elemental del complejo propuesto, $\text{Hg}(\text{C}_{36}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_4)\text{Cl}$

Átomo	Valor teórico,% p/p	Valor experimental,% p/p
C	52.27	52.84
H	4.59	6.05
N	6.77	7.14
Hg*	24.36	18.94*

*Valor determinado mediante digestión ácida del complejo en HCl al 10% y leído por absorción atómica de generación de hidruros (vapor frío)

Con base en los análisis espectroscópicos y la fórmula empírica, se propone la estructura de la figura 8 para el complejo de mercurio denominado cloro-2-[(4-hidroxi-3-metoxibenzilideno)amino]espiro[isoindolina-1,9'-xanteno]-3-ona}mercurio(II).

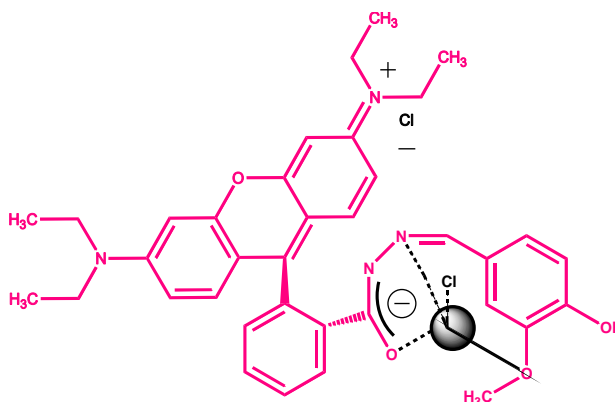


Figura 8. Estructura del quimiosensor (complejo de mercurio).

La estructura propuesta del complejo se base en dos aspectos teóricos importantes: 1) Hg^{+2} es un ion con configuración electrónica $[\text{Xe}]\text{d}^{10}\text{s}^0\text{p}^0$, el cual puede presentar una hibridación sp^3 para tener posibilidad de geometría

tetraédrica o tetraédrica distorsionada y 2) Al ser Hg^{2+} un ácido blando, tendrá preferencia por ligandos polarizables (bases blandas). Por tal razón la estructura propuesta es un complejo con Hg^{2+} como átomo central enlazado covalentemente al oxígeno carbonílico que forma una carga negativa producto de la apertura del anillo espirolactámico, al nitrógeno del enlace imino, al oxígeno del grupo $-\text{OCH}_3$ y la otra carga negativa sería aportada por el ion cloruro.

Además se podría pensar que el ion Cl^- restante (HgCl_2) está neutralizando la carga positiva que finalmente se origina en la amina terciaria del quimiosensor. Compuestos de mercurio con estructura tetraédrica fueron reportados por Culzoni y Muñoz de la Peña¹⁵ quienes publicaron compuestos de Hg con enlaces por oxígeno (grupo carbonílico del anillo de cinco miembros, y con electrones libres) y con nitrógeno.

5.3. ESTANDARIZACIÓN DE LA LECTURA DE FLUORESCENCIA

En la figura 9 se observan las fotografías tomadas en la cámara de fluorescencia, en la cual se ve un cambio de color de la solución con presencia del metal, y al ser irradiado a 365 nm se produce un color naranja. En los trabajos de Culzoni¹⁵, Kim¹⁶, Beija¹⁷ y Yang³² se reportan quimiosensores similares y con base en esto se presume que hay fluorescencia del complejo obtenido.



Figura 9. Fotografías: 3 en solución 1:1 (v/v) Metanol:agua sin y con irradiación, A y C respectivamente; 3: Hg^{2+} en solución sin y con irradiación a 365 nm, B y D respectivamente.

Basado en estos resultados se procedió a realizar medidas en el espectrofluorímetro, para la determinación de las longitudes de onda máxima de excitación y emisión del quimiosensor.

El quimiosensor formado presenta dos longitudes de onda que son de interés para la posterior cuantificación del mercurio (figura 10), la primera es la longitud de onda de excitación a 553 nm, valor muy cercano al obtenido en un espectrofotómetro UV-VIS de 555 nm. Entre tanto, la longitud de onda de emisión fue a 575 nm. Se han reportado tablas¹⁷ donde se muestran las longitudes de onda máxima de excitación y emisión para diversos quimiosensores en la detección de metales como cadmio, plomo, mercurio, entre otros; y al observar las obtenidas para el quimiosensor propuesto, estas son cercanas a las reportadas. Estas longitudes de onda dependen de la parte del ligando, denominada fluoróforo, estrechamente relacionada con la lata conjugación del anillo xantenico que compone la roodamina.

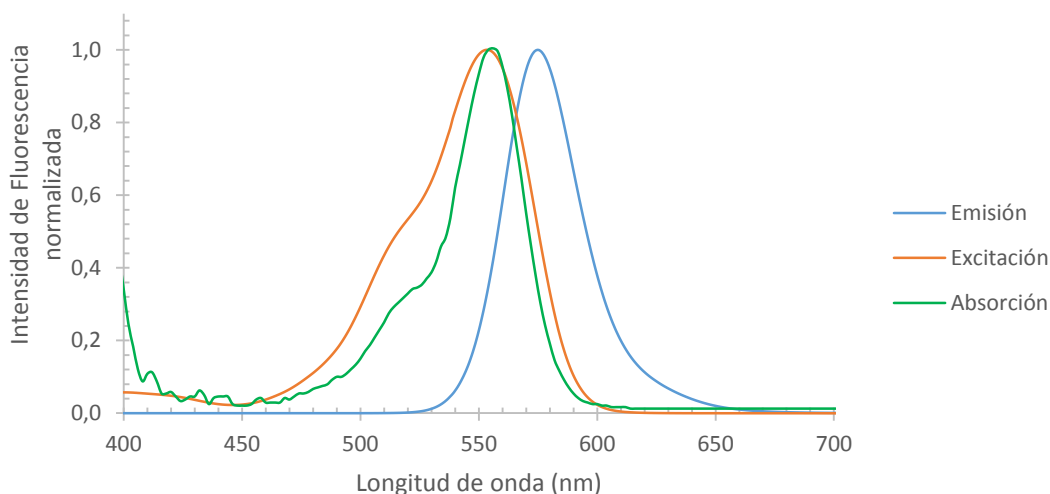


Figura 10. Espectro normalizado de emisión, excitación y absorción de 3 + Hg^{2+} en una solución 1:1 (v/v) Metanol/agua (5 ppm Hg^{2+} , pH 5,65). Los datos de emisión fueron adquiridos a 575 nm. La longitud de onda de excitación es 553 nm.

Los siguientes gráficos evidencian la formación del complejo y las diferencias en unidades de la absorbancia (figura 11) y de la intensidad de fluorescencia (figura 12) con otros iones metálicos evaluados. También se puede observar en las figuras 13 y 14 las fotografías de estos experimentos.

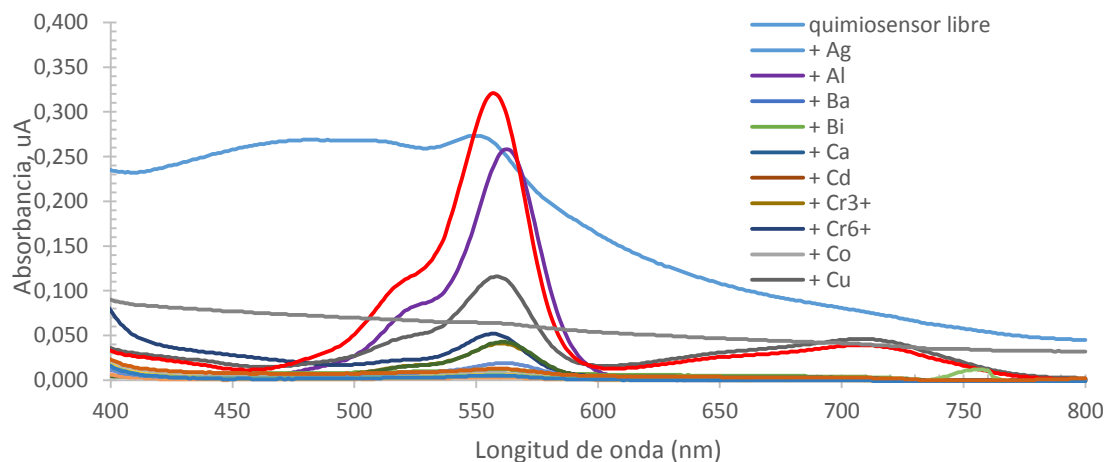


Figura 11. Espectros de absorción de diferentes iones metálicos con **3** en solución 1:1 (v/v) Metanol:agua.

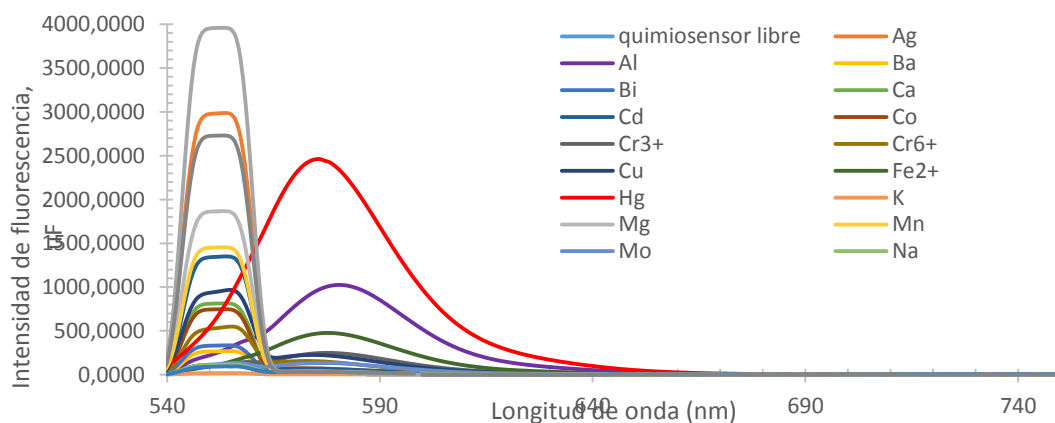


Figura 12. Espectros de emisión de diferentes iones metálicos con **3** en solución 1:1 (v/v) Metanol:agua, excitando a 553 nm.

En las figuras se puede observar que cerca a 553 nm la absorbancia del quimiosensor de mercurio es parecida con otros quimiosensores evaluados que originan un color rosado, violeta o rojo (figura 13), pero que al evaluar las

intensidades se observa una gran diferencia. Pero para Al^{3+} y de Fe^{2+} fluorescen cerca a 575 nm de forma que pueden llegar dar una señal cuando no haya presencia del metal de interes, indicando que el ligando no es selectivo para Hg^{2+} .

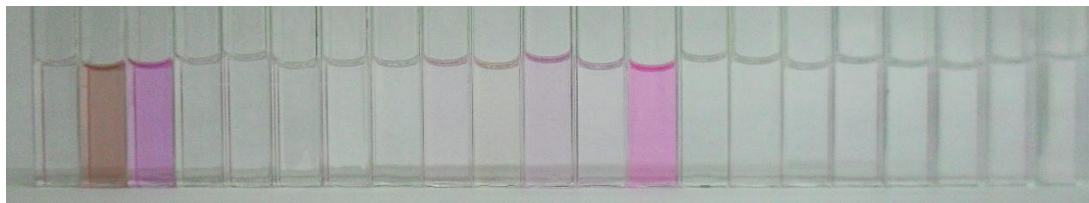


Figura 13. Fotografías: 3 en solución 1:1 (v/v) Metanol:agua sin irradiación a 365 nm con presencia de (de izquierda a derecha): Quimiosensor libre, Ag^+ , Al^{3+} , Ba^{2+} , Bi^{3+} , Ca^{2+} , Cd^{2+} , Cr^{3+} , Cr^{6+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Mo^{4+} , Na^+ , Ni^{2+} , Pb^{2+} y Zn^{2+} .

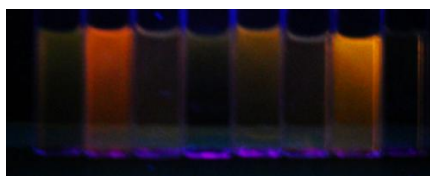


Figura 14. Fotografías: 3 en solución 1:1 (v/v) Metanol:agua con irradiación a 365 nm con presencia de (de izquierda a derecha): Ag^+ , Al^{3+} , Cr^{3+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} y Mo^{4+} .

5.4. ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO USANDO EL QUIMIOSENSOR.

Los resultados obtenidos hasta este momento permitieron evaluar algunos factores que pueden afectar la medida de fluorescencia del quimiosensor, aplicado específicamente para acomplejar mercurio, con el fin de estandarizar un método analítico.

5.4.1. Evaluación de varios tipos de solventes.

Con base en el momento dipolar de diferentes solventes se evaluó la solubilidad del quimiosensor (tabla 4). Los porcentajes de solubilidad más altos correspondieron al acetonitrilo, etanol y metanol; por otro lado se observa en la

misma tabla que el quimiosensor en solución acuosa no es soluble, por lo que se sugiere realizar una segunda etapa donde se evalué la relación de solvente escogido con agua, debido a que esta porción se tendrá el mercurio disuelto.

Tabla 4. Porcentajes de solubilidad del quimiosensor en diferentes solventes.

SOLVENTE	MOMENTO DIPOLAR, μ (D)	SOLUBILIDAD, en % n=2
1,4-Dioxano	0,00	89,21 ; CV=1,25%
Cloroformo	1,01	90,01 ; CV=0,54%
Etanol	1,69	95,16 ; CV=0,88%
Metanol	1,70	93,23 , CV=0,86%
Agua	1,90	1,44 , CV=27,10%
Acetona	2,88	79,58 , CV=2,67%
Acetonitrilo	3,92	93,44 , CV=1,75%

Debido a que el quimiosensor no es soluble solo en agua, es necesario que el solvente a utilizar cumpla con dos requisitos: primero lo solubilice y como segundo requisito era necesario que el solvente sea miscible con el agua para que en la mezcla a utilizar se forme el complejo de interés como ocurre con los tres solventes seleccionados. Como resultado el metanol presenta un valor máximo en comparación con las otras dos (figura 15), una explicación a dicho comportamiento podría deberse a la formación de puente de hidrógeno entre el agua y metanol que favorezca la estabilidad del complejo, que no se presenta en el etanol o acetonitrilo, a pesar que el etanol sea más viscoso que el metanol.

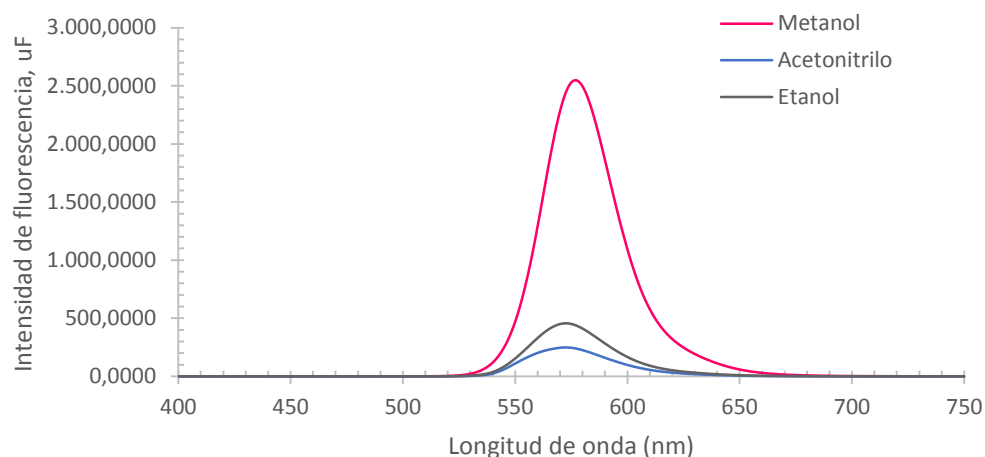


Figura 15. Gráfica de Intensidad de fluorescencia vs longitud de onda de solventes evaluados.

5.4.2. Evaluación para determinar proporción entre Agua:Metanol.

La determinación de la relación (volumen/volumen) de solvente (metanol) y agua, en la cual se tenga una intensidad de fluorescencia máxima y/o constante, permitió obtener la figura 16. Se observa que la intensidad aumenta y se obtiene un máximo de intensidad a una relación de solvente 0,5 respecto al agua (1:1). El comportamiento observado en la gráfica puede deberse a la mayor cantidad de agua en la mezcla, la cual insolubiliza el quimiosensor disminuyendo su intensidad; y para el caso con mayor cantidad de metanol el complejo no es tan estable, probablemente el quimiosensor necesita de la estabilidad de la relación de solventes para formarse.

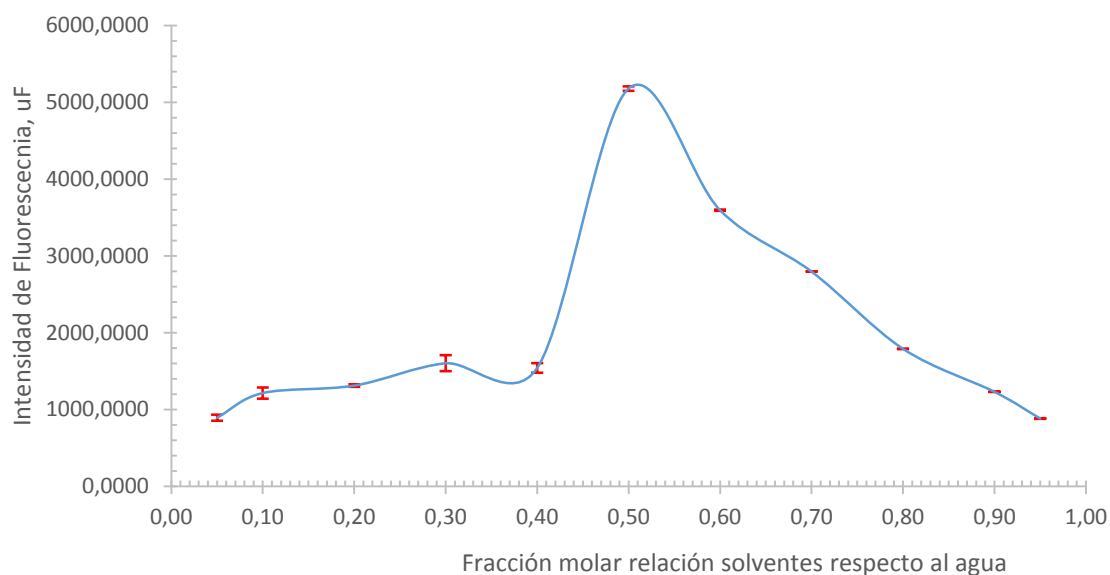


Figura 16. Gráfica de Intensidad de fluorescencia vs proporción Metanol:Agua.

5.4.3. Evaluación del pH.

La figura 17 muestra el comportamiento de la intensidad de fluorescencia dependiente del pH, a valores muy bajos de pH la intensidad del ligando y el quimiosensor es similar, mientras que a pH altos se observa una marcada diferencia en las intensidades de fluorescencia. A pH ácidos, se presume la apertura del anillo espirolactámico (protonación del oxígeno carbonílico o grupo amino) la cual presenta fluorescencia en presencia y ausencia del ion, mientras que a pH altos el grupo carboxílico se encuentra desprotonado, y se sugiere que la presencia de OH^- en solución generan repulsión de cargas e impidiendo la facilidad de la apertura del anillo, con lo cual se puede dar el enlace con el ion metálico.

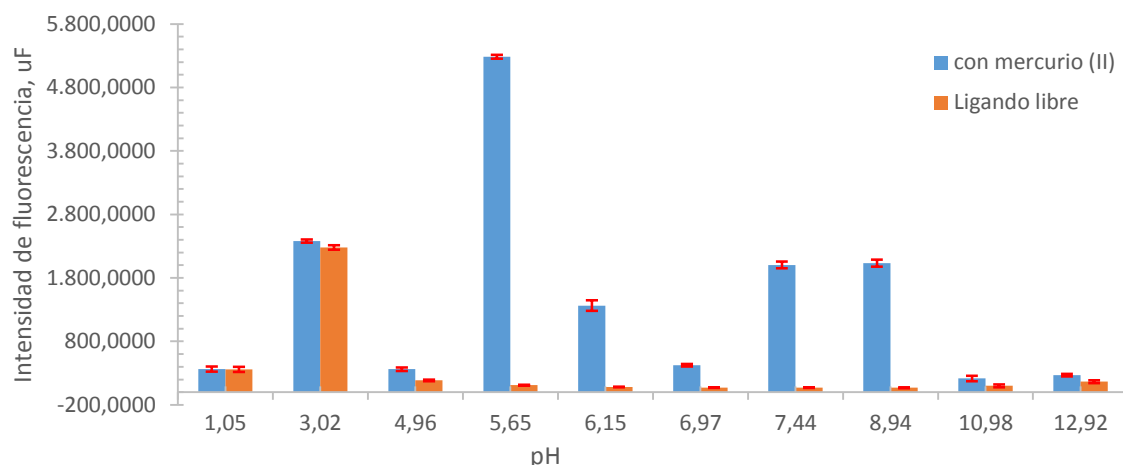


Figura 17. Gráfica de Intensidad de fluorescencia vs pH para determinar el pH óptimo de trabajo.

Se obtuvo que a pH 5.65, la diferencia de intensidades es mayor entre el ligando libre y el ligando con Hg^{2+} , esto podría deberse a que el ligando se encuentra en su forma neutral, es decir no presenta cargas negativas (desprotonación) o positivas (protonación), que impidan la formación del quimiosensor debido a la apertura del anillo espirolactámico o la insolubilización por precipitación.

5.4.4. Evaluación de la relación estequiometría metal:ligando.

Son varios los autores que reportan la importancia de la relación estequiométrica del metal-ligando del quimiosensor con el cual se obtienen los mejores resultados^{24,30}.

La figura 18 muestra las diferentes intensidades del quimiosensor con diferentes cantidades de metal y ligando. Se observa que la variable de respuesta va aumentando hasta llegar a un límite en el cual no aumenta más a una relación estequiométrica 1:2 (metal-ligando). Esta evaluación nos permite encontrar la cantidad de ligando mínima para producir una intensidad de fluorescencia que sea proporcional a la cantidad de Hg^{2+} presente en la solución, en diferentes trabajos^{15,16} se reportan las relaciones estequiometrias entre el metal y el ligando

pero no con fines analíticos sino para cristalización, reportando relaciones 2:1 y 1:1 ligando:Hg²⁺.

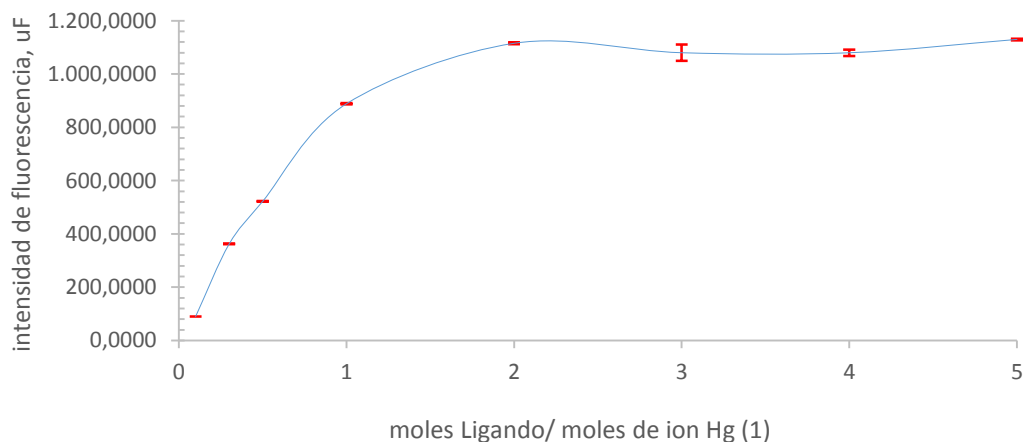


Figura 18. Gráfica de Intensidad de fluorescencia vs Relación Ligando:Hg²⁺.

5.4.5. Determinación del tiempo de formación del complejo.

Con el objetivo de encontrar el tiempo necesario para que el quimiosensor se estabilice, se dejó en reposo por un cierto tiempo hasta que la intensidad de fluorescencia no cambiara. Se encontró una estabilidad del complejo a partir de tres horas, donde la intensidad de fluorescencia llega a mantenerse constante, para esto se tomaron las mediciones desde el momento que se pone en contacto ambas especies (figura 19). Este comportamiento se presume debido a que el quimiosensor debe adquirir una conformación en solución, dependiente del tiempo que toma en ocurrir la apertura del anillo espirolactámico y a la interacción entre el ion metálico con el ligando.

Se recomienda realizar estudios cinéticos para encontrar el orden de reacción y si hay dependencia de la formación debido solo del ligando, solo del ion metálico o de ambos.

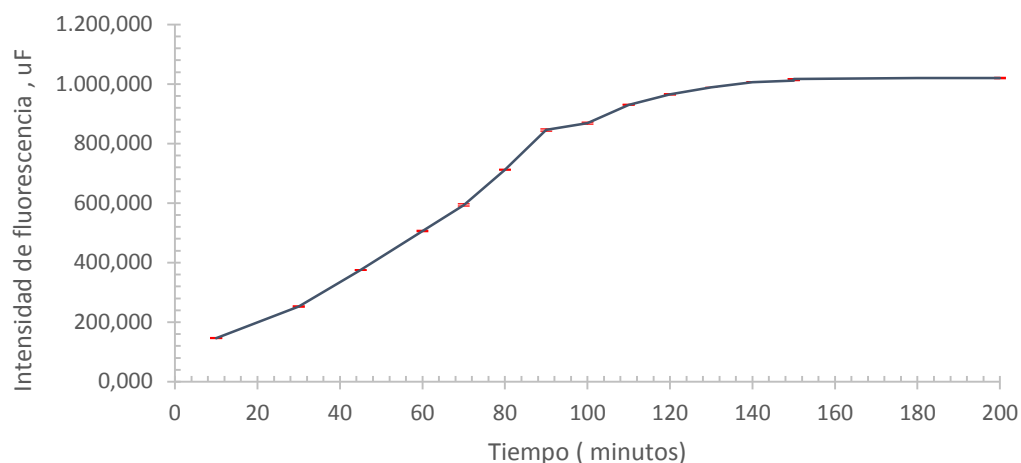


Figura 19. Gráfica de Intensidad de fluorescencia vs tiempo (minutos).

5.5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO USANDO EL QUIMIOSENSOR

5.5.1. Rango lineal.

La tabla 5 muestra las intensidades de fluorescencia para cada estándar en tres diferentes días usando la sensibilidad baja del instrumento. La determinación del rango lineal se hizo haciendo comparaciones de medias de los residuos de cada curva, utilizando la distribución t.

Tabla 5. Datos de intensidad de fluorescencia para los estándares preparados en tres días diferentes medidos a sensibilidad baja.

Mercurio, en ppb	Día 1	Día 2	Día 3	Promedio
1.002	1.1000	1.4675	0.8327	1.1334
2.003	1.2484	1.4829	1.5912	1.4408
4.007	2.1504	2.7246	2.5266	2.4672
6.010	3.0996	3.4477	3.2894	3.2789
8.013	3.9175	4.4393	3.9311	4.0960
10.016	5.0273	5.3957	6.3485	5.5905

20.033	10.3156	10.8141	7.3993	9.5097
40.065	18.6014	15.7640	18.6900	17.6852
60.098	28.2495	32.8540	27.6129	29.5721
80.130	36.3143	38.4195	35.7947	36.8428
100.163	46.0489	45.4634	47.2854	46.2659
120.195	54.4844	55.3329	52.7529	54.1900
140.228	62.7965	64.0695	60.2268	62.3643
160.260	72.3714	80.0459	70.3216	74.2463
180.293	82.2595	82.4598	80.3128	81.6774
200.326	91.5896	89.7414	90.9080	90.7463
1000.002	457.9936	506.7620	448.0975	470.9511
5000.008	1818.7281	1853.0563	1937.4341	1869.7395

La tabla 6 muestra los datos y resultados utilizados para realizar el cálculo y la decisión de aceptar o no la hipótesis nula.

Tabla 6. Resultados de los cálculos para evaluar los residuos, para el rango lineal.

RESIDUOS, r									
r1	r2	r3	r promedio	S ²	Fcal	Caso	S	tcal	Acepta Ho
2.5333	2.9478	2.2319	2.5710	0.1292	3.31	I	0.29005517	1.46	SI
2.7006	2.9651	3.0873	2.9177	0.0391	2.77	I	0.27135493	5.22	NO
3.7180	4.3655	4.1422	4.0752	0.1082	2.80	I	0.27095565	4.14	SI
4.7884	5.1810	5.0025	4.9906	0.0386	2.91	I	0.27491574	4.10	SI
5.7107	6.2993	5.7261	5.9121	0.1125	5.25	I	0.59316602	3.48	SI
6.9624	7.3778	8.4523	7.5975	0.5912	7.32	I	1.56821848	3.45	SI
12.9263	13.4886	9.6374	12.0174	4.3274	1.23	I	1.98123706	5.70	NO
22.2708	19.0709	22.3707	21.2375	3.5232	2.95	I	2.63876519	6.22	NO

33.1515	38.3444	32.4336	34.6432	10.4030	4.23	I	2.53575003	3.96	SI
42.2468	44.6209	41.6607	42.8428	2.4570	2.23	I	1.33369774	9.76	NO
53.2251	52.5648	54.6195	53.4698	1.1005	0.50	I	1.28443057	8.52	NO
62.7383	63.6952	60.7856	62.4064	2.1991	2.22	I	1.88048342	6.00	NO
72.1125	73.5481	69.2144	71.6250	4.8734	6.86	I	4.37570231	3.75	SI
82.9107	91.5657	80.5990	85.0251	33.4202	18.68	I	4.19577543	2.45	SI
94.0621	94.2880	91.8668	93.4056	1.7889	1.61	I	1.20414703	10.40	NO
104.5843	102.4999	103.8156	103.6333	1.1111	1129.05	II	25.0553742	20.96	NO
517.8019	572.8012	506.6414	532.4148	1254.4325	3.78	I	54.7740294	35.27	NO
2052.3904	2091.1046	2186.2629	2109.9193	4745.9561	0.00	I	48.7132225	53.05	NO
					F crit(f:2,f:2) DOS COLAS,95%		T crit(f:2) DOS COLAS,95%	4,30	
					39,00				

El rango lineal a sensibilidad baja fue de 1 ppb a 60 ppb Hg^{2+} , a sensibilidad media de 1 ppb a 10 ppb Hg^{2+} y a sensibilidad alta 1 ppb a 10 ppb Hg^{2+} . Considerando este comportamiento se dirá que trabajando el equipo en una mayor sensibilidad permite disminuir el rango de trabajo y cuantificar concentraciones menores del metal.

5.5.2. Linealidad.

La linealidad para cada sensibilidad del instrumento se evaluó, en primera parte, mediante una prueba estadística para evaluar el coeficiente de correlación (r) entre los valores de x y y de tal forma que se establezca las relaciones matemáticas de la relación de proporcionalidad (lineal). Por otra parte se determinaron los intervalos de confianza de las curvas de calibración, preparadas en tres días diferentes.

En la siguiente tabla se muestra las diferentes ecuaciones de las rectas y sus respectivos límites de confianza, utilizando las tres sensibilidades del equipo.

Tabla 7. Resultados de los intervalos de confianza para las tres sensibilidades.

Sensibilidad del equipo	$Y=(\bar{m} \pm \frac{tS_n}{\sqrt{n}})X + (\bar{b} \pm \frac{tS_n}{\sqrt{n}})$
Baja	$Y=(0.47 \pm 0.03)X + (0.45 \pm 0,09)$
Media	$Y=(6.8 \pm 0.5)X + (4 \pm 1)$
Alta	$Y=(77 \pm 9)X + (142 \pm 82)$

Las siguiente graficas representa el intervalo de confianza para el rango lineal de trabajo para cada sensibilidad del instrumento, baja, media y alta respectivamente.

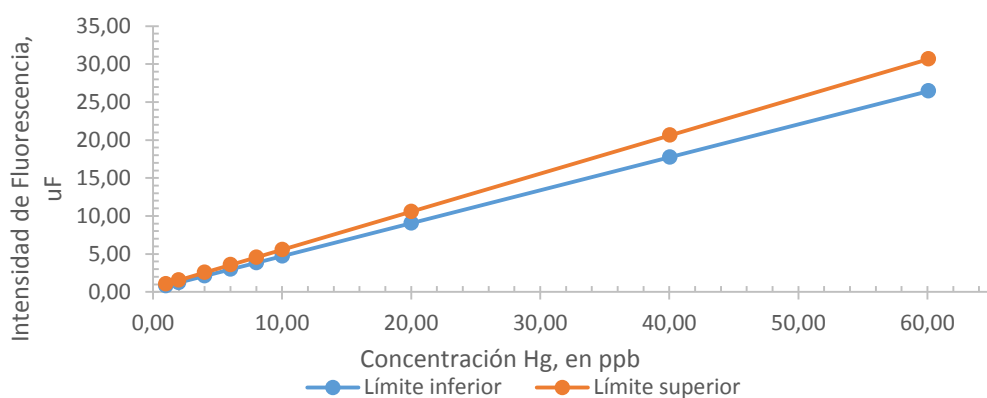


Figura 20. Intervalo de confianza para las curvas de calibración a sensibilidad baja.

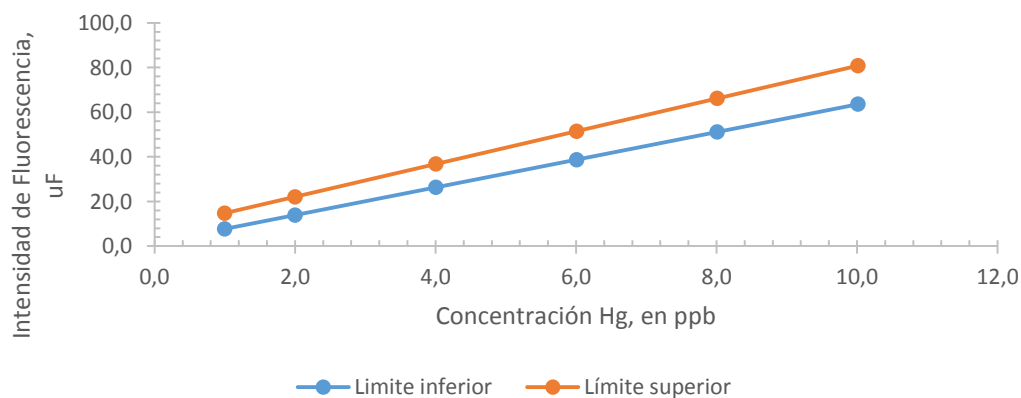


Figura 21. Intervalo de confianza para las curvas de calibración a sensibilidad media.

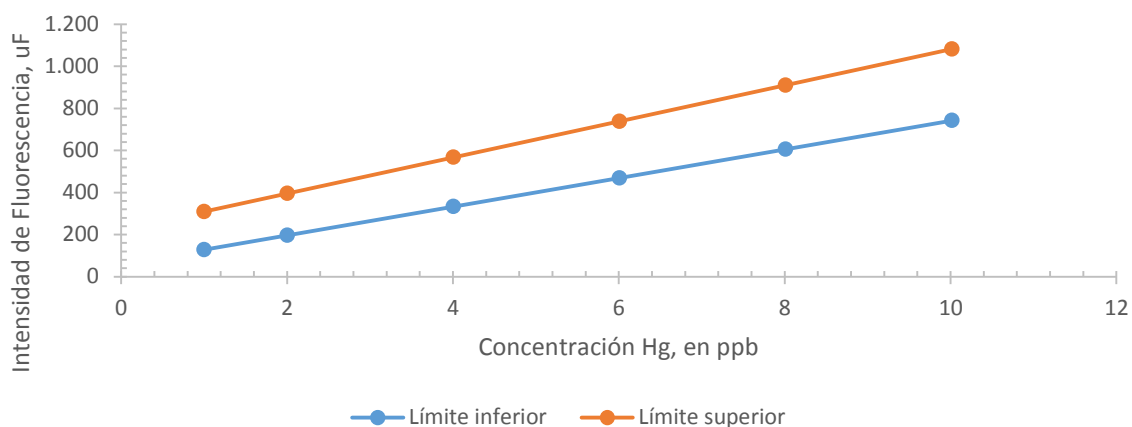


Figura 22. Intervalo de confianza para las curvas de calibración a sensibilidad alta.

Observando las tres graficas anteriores, se concluye que los correspondientes límites de confianza son más amplios al incrementar la sensibilidad del equipo, se presume que se debe a la mayor desviación de los datos asociado a las concentraciones bajas (< 10 ppb) que se pueden detectar.

5.5.3. Precisión.

En la tablas 8, se muestra las concentraciones obtenidas para diferentes mediciones de una misma muestra (repetitividad) y de esta muestra preparada 6 veces en días diferentes (reproducibilidad) a sensibilidad baja del equipo, tomados como ejemplo de discusión.

Tabla 8. Resultados de la precisión del método a sensibilidad baja del equipo.

	Repetitividad Mercurio, en ppb	Reproducibilidad Mercurio, en ppb			
1	2.093	1.981	2.271	1.821	
2	1.982	1.962	2.238	1.741	
3	2.074	1.963	2.250	1.716	
4	2.083	1.913	2.065	1.782	
5	2.114	1.901	2.015	1.716	
6	2.144	1.912	1.989	1.703	TODOS
Promedio	2.082	1.939	2.138	1.746	1.941
Desviación estándar	0.055	0.034	0.129	0.046	0.181

Varianza	0.003	0.001	0.017	0.002	0.033
L.Confianza	0.06	0.04	0.1	0.05	0.09
CV	2.63	1.73	6.0	2.64	9.34
CV horwitz	40.53	40.96	40.4	41.61	40.96

Con base, a los coeficientes de variación (en negrilla), los cuales expresan la variabilidad de los datos, tanto para la repetitividad como para la reproducibilidad, y al compararlos con los coeficientes de Horwitz, se puede decir que el método es preciso porque los CV encontrados variando el día y las diferentes preparaciones de la muestra, no superan el valor calculado para cada concentración encontrada, pero se debe tener en cuenta que el coeficiente de Horwitz es solamente dependiente de la concentración. También es de recalcar que se encontró menor variabilidad de los datos en la repetitividad a sensibilidad alta debido a que en cortos tiempos de medición la sensibilidad no presenta mayor dispersión en los datos y para la reproducibilidad hay menor variabilidad a sensibilidad baja, respecto a que a menor sensibilidad las dispersión de los datos para diferentes tratamientos de muestras es menor, como se observa en los intervalos de confianza de las curvas de calibración a esta sensibilidad instrumental. Pero se obtienen en promedio CV menores al 5% para la sensibilidad baja y media del equipo, y menores a 10% para la sensibilidad alta, lo que indica una buena precisión del instrumento.

5.5.4. Exactitud.

En la tabla 9, se observan los porcentajes de recuperación obtenidos para cada nivel de dopaje a las tres sensibilidades del equipo.

Tabla 9. Porcentajes de recuperación a las tres sensibilidades del equipo.

Nivel de dopaje, mercurio, en ppb	Sensibilidad baja, recuperación en %	Sensibilidad media, recuperación en %	Sensibilidad alta, recuperación en %
2 (Bajo)	53	59	16
6 (Medio)	93	91	88

10 (Alto)	73	100	133
-----------	----	-----	-----

Este parámetro tiene que ver con la premisa, que dice: la recuperación del método no debe diferir estadísticamente del 100%, para la se realiza comparación con un valor de referencia (100%) utilizando distribución t. La hipótesis nula es “el porcentaje de recuperación no difiere estadísticamente del 100%”, donde el criterio de decisión está relacionado con el t experimental que debe ser menor que el valor de t tabulado para no rechazar la hipótesis nula. Los porcentajes en la tabla 9, en negrilla, al realizar los cálculos estadísticos, no son significativamente diferentes al 100%. Se puede concluir que para un nivel de dopaje de 2 ppb para las tres sensibilidades del equipo, el método no sería exacto, se atribuye al tratamiento de muestra, presencia de iones, competencia de estos por el quimiosensor en solución y a la mayor variabilidad de los resultados a concentraciones tan bajas (2 ppb Hg^{2+}); en cambio si lo es para los otros dos niveles.

5.5.5. Sensibilidad analítica: Límite de detección y Límite de cuantificación.

Con los resultados de los blancos se puede determinar el límite de detección, y el de cuantificación, mediante las ecuaciones 6 y 7 de la tabla 2, los resultados de las mediciones y los límites encontrados en las tres sensibilidades del instrumento se muestran en la tabla 11. Los límites de detección encontrados permiten medir concentraciones hasta 0.9 ppb, 0.5 ppb y 0.1 ppb a sensibilidades baja, media y alta respetivamente, y los límites de cuantificación encontrados fueron de 2.9 ppb, 1.8 ppb y 1ppb respectivamente. Observando que a mayor sensibilidad del equipo hay menor límite de detección y cuantificación, y a su vez van incrementando al disminuir la sensibilidad del instrumento.

Este método de acuerdo las parámetros evaluados a las tres sensibilidades instrumentales, indica que si es posible aplicarlo para la determinación de mercurio en agua a niveles de trazas y además se sugiere utilizar la sensibilidad

media del instrumento, porque se obtiene un rango lineal entre 0.5 y 10 ppb, se minimiza la dispersión de los datos en la precisión y se obtiene recuperaciones por encima del 90 %.

El método, empleando esta sensibilidad instrumental, utilizado en una matriz como agua, se acerca al clásico (absorción atómica por generación de vapor frío, GVF) en cuanto a que se obtiene un límite de cuantificación cerca de los 2 ppb de mercurio, valor sugerido para el primer estándar al emplear GVF.

Tabla 10. Datos y resultados de los cálculos estadísticos para la determinación de la sensibilidad analítica.

BLANCOS	Sensibilidad Baja, en Intensidad de Fluorescencia	Sensibilidad Media, en Intensidad de Fluorescencia	Sensibilidad Alta, en Intensidad de Fluorescencia
1	0.426	3.307	138.337
2	0.391	3.524	118.342
3	0.391	3.853	108.678
4	0.653	3.116	130.988
5	0.711	2.995	110.497
6	0.710	2.855	120.473
7	0.524	3.763	130.609
8	0.512	5.701	122.386
9	0.521	6.219	122.300
Promedio	0.538	3.926	122.512
Desviación Estandar	0.127	1.207	9.651
3S	0.381	3.621	28.953
10S	1.27	12.07	96.51
Límite de confianza	0.1	0.9	7

LD, ppb Hg ²⁺	0.9	0.5	0.1
LC, ppb Hg ²⁺	2.9	1.8	1

6. CONCLUSIONES

Se sintetizó un ligando para determinar mercurio, mediante la reacción entre la rodamina B hidrazida con 3-metil-4-hidroxibenzaldehído, con un porcentaje de rendimiento del 78%.

Se sintetizó un quimiosensor entre el ligando sintetizado y el mercurio presentando una longitud de onda máxima de excitación a 553 nm y una de máxima emisión a 575 nm.

Se encontraron las condiciones experimentales del método para la cuantificación de mercurio: temperatura ambiente, solvente Agua:Metanol (1:1), pH 5.65, relación estequiométrica metal:ligando 1:2, y tiempo de reacción superior a 3 horas.

La validación del método arrojó un rango lineal hasta 60 ppb en la sensibilidad instrumental baja y hasta 10 ppb en las otras dos sensibilidades (media y alta)

El método tiene un coeficiente de variación entre 1,0 hasta 10,0, el cual se considera preciso, en términos de reproducibilidad y repetitividad tomando el coeficiente de Horwitz como referencia.

La exactitud del método depende de la sensibilidad del instrumento. A sensibilidad baja la recuperación es del 73%, media 91% y alta 88%, los cuales se consideran exactos para niveles de dopajes altos (6 y 10 ppb Hg²⁺).

Los límites de detección encontrados a las tres sensibilidades del instrumento fueron 0.9, 0.5 y 0.1 ppb para las sensibilidades baja, media y alta respectivamente. Y los límites de cuantificación encontrados a las tres sensibilidades del instrumento fueron 2.9, 1.8 y 1 ppb para las sensibilidades baja, media y alta respectivamente.

7. RECOMENDACIONES

Se recomienda un estudio fisicoquímico completo del quimiosensor, con el fin de obtener mayor información que permita dilucidar su estructura en estado sólido y en solución.

Es preciso evaluar y controlar otros factores que afecten la fluorescencia del quimiosensor, por ejemplo la viscosidad, inhibidores de fluorescencia y estudio de presencia de diferentes aniones.

Se recomienda hacer otras modificaciones a la Rodamina B para obtener otros tipos de ligandos que puedan dar quimiosensores para otros tipos de metales.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Baird, C., Environmental Chemistry. Segunda edición. *W.H. Freeman & Company* **1999**, 65.
2. O'Neill, P., Environmental Chemistry. *Chapman & Hall: London* **2005**, 635.
3. Carrasquero, A.; Adams, M., Comparación de métodos para el análisis de mercurio en suelos procedentes del callao, Estado de Bolívar, Venezuela. *INCI* **2002**, 27 (4), 87.
4. Revelle, P.; Revelle, C., The environment issues and choices for society. Segunda edición. *Willard Grant Press* **1984**.
5. Guiza, L., Perspectiva jurídica de los impactos ambientales sobre los recursos hídricos provocados por la minería en Colombia. *Opinión Jurídica, edición especial* **2011**, 166, 123-140.
6. Sepúlveda, L. E.; Agudelo, L. M.; Arengas, A. I., El mercurio, sus implicaciones en la salud y en el ambiente. Primera edición. *Instituto Nacional de Ecología* **2006**, 9.
7. Valiente, L., Determinación del nivel de mercurio en aguas y soluciones ácidas. Instituto nacional de Tecnología Industrial (INTI) – Química, Laboratorio de Análisis de Trazas **2005**.
8. Housecraft, C.E.; Sharpe, A.G., Química Inorgánica. Segunda Edición. *Editorial Pearson Prentice Hall* **2006**, 423.
9. Antuña, I. P., Efectos Toxicológicos e Impacto Ambiental del Mercurio. Validaciones y Sistemas de control de calidad de ensayos químicos bajo sistema de calidad ISO 17025:2005. Rosario.Argentina **2007**, 22.
10. Ministerio de Minas y Energía de Colombia, Unidad de planeamiento Minero Energético UPME, Alteraciones neurocomportamentales en personas expuestas a mercurio en la actividad minera del oro en el municipio de Segovia (Antioquia), **2005**.
11. Gamboa, W.L., Speciation of mercury in environmental samples, *Tesis de Maestría*, Universidad de Barcelona, Departamento de Química, Unidad de Química Analítica **2010**.
12. World Health Organization. Guidelines for Drinking-water Quality. Fourth edition. *WHO Library Cataloguing-Publication Data* **2011**, 307-479.

13. Lakowick, J. R., Principles of Fluorescence Spectroscopy. Third Edition. *Springe* **2006**, 5-10.
14. Nakamoto, K., Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds. Fourth Edition. *John Wiley y Sons* **1986**, 191-300.
15. Culzoni, M. J.; Muñoz de la Peña, A.; Machuca, A.; Goicoechea, H. C.; Rubiano, R., Rhodamine and BODIPY chemodosimeters and chemosensors for the detection of Hg^{2+} , based on fluorescence enhancement effects. *Anal. Methods* **2013**, (5), 30-49.
16. Kim, H. N.; Ren, W. X.; Kim, J. S.; Yoon, J., Fluorescent and colorimetric sensors for detection of lead, cadmium, and mercury ions. *Chem.Soc.Rev.* **2012**, (41), 3210-3244.
17. Beija, M.; Afonso, C. A. M.; Martinho, J. M. G., Synthesis and applications of Rhodamine derivates as fluorescents probes. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, (38), 2410-2433.
18. Bernard, V., Molecular Fluorescence: Principles and Applications. *Wiley* **2001**, 273-274.
19. Desvergne, J. P.; Czarnik, A. W. Chemosensors for Ion and Molecule Recognition; *Kluwer Academic Publishers: London* **1997**, 1-15.
20. Suksai, C.; Tuntulani, T., Chromogenic anion sensors. *Chemical Society Reviews* **2003**, 32 (4), 192-202.
21. Kim, H. N.; Guo, Z.; Zhu, W.; Yoon, J.; Tian, H., Recent progress on polymer-based fluorescent and colorimetric chemosensors. *Chemical Society Reviews* **2011**, 40 (1), 79-93.
22. Chen, J.; Zheng, A.; Chen, A.; Gao, Y.; He, C.; Kai, X.; Wu, G.; Chen, Y., A functionalized gold nanoparticles and Rhodamine 6G based fluorescent sensor for high sensitive and selective detection of mercury(II) in environmental water samples. *Analytica Chimica Acta* **2007**, 599 (1), 134-142.
23. Zheng, H.; Zhan, X.-Q.; Bian, Q.-N.; Zhang, X.-J., Advances in modifying fluorescein and rhodamine fluorophores as fluorescent chemosensors. *Chemical Communications* **2013**, 49 (5), 429-447.
24. Kubin, R.; Fletcher, A., Fluorescence quantum yields of some rhodamine dyes. *J.of Fluorescence* **1996**, 6 (2).

25. Contreras, W. A., Construcción de un modelo predictivo de la fracción S.A.R.A. de crudos colombianos a partir de espectroscopia (LIF) y métodos estadísticos (Quimiometría). Universidad industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Laboratorio de Espectroscopía Atómica y Molecular **2011**.
26. Harvey, D., Química Analítica Moderna. Editorial McGraw- Hill/Interamericana de España, Madrid-España **2002**, 542.
27. Winefordner, J. D., Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry. Department of Chemistry and Environmental Science. New Jersey Institute of Technology **2003**, 162, 472.
28. Balint, L.; Vedrina-Dragojević, I.; Šebečić, B. e.; Momirović-Čuljat, J.; Horvatić, M., Spectrofluorometric method for determination of the total mercury content in environmental samples — Waste waters. *Microchimica Acta* **1997**, 127(1-2), 61-65.
29. Dujols, V.; Ford, F.; Czarnik, A., A long-Wavelength Fluorescent Chemodosimeter Selective for Cu(II) Ion in Water. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 7386-7387
30. Kwon, S. K.; Kim, H. N.; Rho, J. H.; Swamy, K. M. K.; Shanthakumar, S. M.; Yoon, J., Rhodamine Derivative Bearing Histidine Binding Site as a Fluorescent Chemosensor for Hg²⁺. *Notes* **2009**, 30 (3), 719.
31. Su, W. Q.; Yang, B. Q., Novel Highly Selective Fluorescent Chemosensors for Hg(II). *Chemical Research in Chinese Universities* **2013**, 29 (4), 657-662.
32. Yang, Y.; Zhao, Q.; Feng, W.; Li, L., Luminescent Chemodosimeters for Bioimaging. *Chemical Reviews* **2013**, 113 (1), 192-270.
33. Chen, X.; Nam, S.-W.; Jou, M. J.; Kim, Y.; Kim, S.-J.; Park, S.; Yoon, J., Hg²⁺ Selective Fluorescent and Colorimetric Sensor: Its Crystal Structure and Application to Bioimaging. *Organic Letters* **2008**, 10 (22), 5235-5238.
34. Lippard, S. J.; Nolan, E. M., Tools and tactics for the optical detection of mercuric ion. *Chem. Rev.* **2008**, 108, 3443-3480.
35. Wang, R. Y.; Jiang, L.; Wang, L.; Zhang, B.; Yin, G., Cell compatible fluorescent chemosensor for Hg²⁺ with high sensitivity and selectivity based on the rhodamine fluorophore. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2010**, 4438-4443.